

Optimierung nukleärer Promotoren in

Chlamydomonas reinhardtii

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Anna Kirchmayr, MSc

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Peter Hegemann
2. Prof. Dr. Christoph Griesbeck
3. Prof. Dr. Kristina Kühn

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2015

Zusammenfassung

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* dient als Modellorganismus und ist aufgrund des „generally regarded as safe (GRAS)“-Status, des schnellen, kostengünstigen Wachstums und der Möglichkeit posttranslationaler Modifikationen im Kerngenom, als Expressionssystem für Nischenprodukte der Biotechnologie wie beispielsweise orale Impfstoffe sehr interessant. Herausforderungen sind hierbei die im Vergleich zu konventionell verwendeten Expressionssystemen sehr geringen Expressionsraten im Kerngenom der Grünalge. Daher sollten in dieser Arbeit neuartige, teils induzierbare, Promotorkonstrukte verwendet und mittels Luciferase-Reporter auf ihre Expressionssteigerung hin getestet werden. Zunächst wurden ausgewählte Promotoren des *Chlorella-Virus-1 (PBCV-1)* verwendet, diese führten allerdings zu keiner Expression des Reporters *Renilla-Luciferase*. Außerdem wurden synthetische, aneinandergereihte Hitzeschockelemente in Kombination mit dem endogenen Rubisco-Promotor (*RBCS2*) kombiniert und mittels Reporteranalyse auf die Expressionsraten analysiert. Dabei ergab sich bei der Kombination aus dem synthetischen Hitzeschockelement in achtfacher Wiederholung (HSE8x) mit *RBCS2* eine Stunde nach der Induktion mit Hitze eine Steigerung der Expressionsrate der Luciferase. Diese war um das bis zu dreifache höher im Vergleich zum bisher stärksten Promotorelement *HSP70A-RBCS2*. Die Basalexpression war hierbei bei HSE1x-*RBCS2* am höchsten und erreichte Expressionslevels, welche um das bis zu fünffache höher lagen als die Positivkontrolle *HSP70A-RBCS2*. Mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) mit dem Antikörper gegen den *C.reinhardtii*-internen Hitzeschockfaktor1 (HSF1) konnte gezeigt werden, dass eine Bindung an das synthetische Hitzeschockelement vorliegt und deshalb die Expression unter Kontrolle dieser cis-regulierenden Elemente über die konventionelle Hitzeschockantwort in *Chlamydomonas reinhardtii* funktioniert.

Im Gegensatz zur Luciferase benötigen Fluoreszenzproteine als Reporter kein Substrat. Infolge dieses Vorteils und der zusätzlichen Möglichkeiten der FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit tagRFP als neuer Reporter in *C. reinhardtii* etabliert.

Die Erhöhung der Expressionsrate durch neue konstitutive und hitzeinduzierbare Promotorkombinationen und die Anwendung von tagRFP als neuen Fluoreszenzreporter bedeuten wichtige weitere Schritte in der Etablierung von *C.reinhardtii* als Expressionssystem für Produkte in der Biotechnologie.

Schlagwörter: *Chlamydomonas reinhardtii*, Promotor, Fluoreszenzreporter, Hitzeschock, tagRFP, HSE

Abstract

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* which is used as a model organism could be a very interesting expression system for some products of biotechnology like oral vaccine. This is because the alga is generally regarded as safe (GRAS), it shows fast growth rates and culturing is cheap. Furthermore it offers the possibility of posttranslational modifications. Challenges lie in the low expression rates in the nuclear genome of the alga when compared to other already used expression systems. Therefore the first step in this work was to test whether selected *Chlorella* virus *PBCV-1* promoters, do lead to enhanced expression rates in the green alga, but there was no detectable expression of the reporter gene luciferase. Furthermore synthetic repeats of heat shock elements were used in this work in combination with the endogenous rubisco-promoter (*RBCS2*) and analysed for expression rates via luciferase reporter measurements. The combination of synthetic heat shock elements in eightfold repeats (HSE8x) in combination with *RBCS2* enhanced expression rates of reporter luciferase 1 h after heat shock up to threefold in comparison with the up to now strongest known promoter combination *HSP70A-RBCS2*. Basalexpression turned out to be best for the HSE1x-*RBCS2* promoter and reached expression levels even fivefold higher compared to the positive control *HSP70A-RBCS2*. To examine if the artificial heat shock elements (HSEs) are bound by the heat shock factor 1 in *C. reinhardtii* a chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) with HSE8x-*RBCS2* and the antibody of internal HSF1 of *C. reinhardtii* was done. It could be shown that HSF1 binds synthetic HSE and therefore one can explain the heat shock inducibility of HSEs is regulated via the same conserved heat shock response in *C.reinhardtii* like this is the case for other HSEs in this green alga. In contrast to luciferase fluorescence proteins when used as reporters do not need substrate. Because of this advantage and the additional possibility of FACS analyses and fluorescence microscopy tagRFP was established as new reporter in *C.reinhardtii*. Enhancement of expression rates through new constitutive and heat inducible promoter combinations and the possible use of tagRFP as new fluorescence reporter are significant further steps in establishing *C.reinhardtii* as expression system for products in biotechnology.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, promoter, fluorescence reporter, heat shock, tagRFP, HSE

Widmung

Ich widme diese Arbeit meiner verstorbenen Mama,
meinem Freund Stefan und
meinem Papa.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Peter Hegemann bedanken, welcher mir als FH-Absolventin eine Dissertation an der renommierten Humboldt-Universität zu Berlin ermöglichte.

Auch meinem Betreuer am MCI Prof. Christoph Griesbeck möchte ich recht herzlich für die wertvolle Unterstützung danken. Danke, dass du dir immer Zeit für wissenschaftliche Diskussionen genommen hast und ein ganz besonderer Dank auch für den Rückhalt in der für mich privat schwierigen Zeit.

Danken möchte ich auch dem MCI als Hochschule, welche sich trotz des momentan noch fehlenden Promotionsrechts dafür eingesetzt hat Dissertantenstellen zu schaffen und so einerseits die Forschung sehr stark vorantreiben konnte und andererseits mir als eine der ersten Dissertantinnen mit finanzieller Unterstützung unter die Arme greifen konnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Thomas Czerny vom FH Campus in Wien, welcher uns durch ein zufälliges Gespräch auf einer Tagung auf seine synthetischen HSEs aufmerksam gemacht und uns die Sequenzen zur Verfügung gestellt hat. Er hat sich immer die Zeit genommen meine Fragen zu beantworten. Thomas du hast mir mit deiner Idee und deinen Anregungen einen sehr guten Anhaltspunkt für die vorliegende Arbeit geliefert. Danke!

Herrn Prof. Michael Schroda möchte ich für die interessanten Anregungen zu Hitzeschockantwort und Hitzeschockpromotoren in *Chlamydomonas* danken. Er hat mir als der Experte zu diesem Thema den Rücken gestärkt in unserer wie er es nannte „mutigen“ Idee synthetische HSEs in Chlamy zu testen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ruben Sommaruga am Institut für Ökologie der Universität Innsbruck danke ich für die Möglichkeit die FACS Analysen dort durchführen zu können. Besonders danken möchte ich hierbei Hannes und Salvador für ihre Geduld.

Ich hatte das große Glück durchwegs motivierte, fleißige und engagierte MasterstudentInnen zu haben. Vielen Dank an Sonja Kothgassner, Stefan Hochrainer und Marc Lechner.

Auch meinen BachelorstudentInnen Johanna Gutleben, Samuel Huter und Florian Keller gilt ein ganz besonderer Dank. Trotz ihres zeitlich begrenzten Laboraufenthalts konnten sie wichtige Klonierungsschritte zu meiner Dissertation beitragen.

Meinen im Rahmen des Projekts des Tiroler Wissenschaftsfonds angestellten Mitarbeitern Stefan Hochrainer, Sebastian Perkams und Fabian Guggenberger möchte ich ebenfalls für ihren Einsatz danken.

Meinen ArbeitskollegInnen am MCI möchte ich für die schöne Zeit danken. Danke, Claudia, für die vielen Aufmunterungen, die Diskussionen während gemeinsamer Kaffeepausen und die fachliche Unterstützung und Korrektur. Recht herzlichen Dank auch dir, Sonja. Du warst während turbulenter Zeiten immer der Ruhepol und hast mir somit sehr oft geholfen nicht aufzugeben. Alexander und Martina, euch möchte ich für die tolle fachliche Unterstützung danken. Danke an dich, Martina, für viele gute Anregungen vor allem zu Fluoreszenzproteinen.

Meinem Bürokollegen Sebastian möchte ich für die Geduld danken, dass er meine Launen stets ertragen hat und mich immer wieder dazu ermutigt hat, diese Arbeit abzuschließen.

Meinen Dissertantenkollegen: Martin und Tobias danke ich für geteiltes Leid, Sorgen und Spaß während unserer gemeinsamen Bürozeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinem Freund Stefan. Ohne euch hätte ich die Dissertation wohl nie fertiggestellt! Danke fürs Korrekturlesen trotz unverständlicher bla ble bla Abkürzungen!

Mama ich werde dich nie vergessen und dich stets in meinem Herzen in liebevoller Erinnerung weiterleben lassen.

Diese Arbeit wurde gefördert durch den Tiroler Wissenschaftsfonds TWF und das MCI Doctoral Grant Program.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Abstract	III
Widmung	IV
Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	XI
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XIV
Diagrammverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
1.1 Die Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1
1.2 Kultivierung und Transformation von <i>C. reinhardtii</i>	3
1.3 <i>C. reinhardtii</i> als Expressionssystem	4
1.4 Steigerung der Expressionsrate im Kerngenom von <i>C. reinhardtii</i>	12
1.5 Selektionsmarker in <i>C. reinhardtii</i>	14
1.6 Promotorsysteme in <i>C. reinhardtii</i>	16
1.7 Hitzeschockantwort in <i>C. reinhardtii</i>	18
1.8 Der Promotor HSP70A aus <i>C. reinhardtii</i>	19
1.9 Reporterproteine in <i>C. reinhardtii</i>	20
1.9.1 <i>Renilla reniformis</i> Luciferase- <i>crluc</i>	22
1.9.2 GFP	23
1.9.3 tagRFP	23
1.9.4 mCherry	24
1.9.5 Vergleich tagRFP-mCherry	25
1.9.6 Weitere Fluoreszenzproteine in <i>C. reinhardtii</i>	26
2 Ziel der Arbeit	27
3 Ergebnisse	29
3.1 Etablierung der Enzym-Messung mit aufgereinigter <i>Renilla</i> Luciferase	29
3.2 Die Promotoren des <i>Chlorella</i> Virus <i>PBCVI</i>	30
3.3 Luciferase Expressionsmessungen mit den synthetischen Promotorkonstrukten HSE1x-6x-RBCS2 und HSE8x-RBCS2	34

3.3.1	Klonierung HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> , HSE8x- <i>RBCS2</i>	34
3.3.2	Messung der Luciferase-Standardexpression mit den Promotorkombinationen HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	35
3.3.3	Standardexpression HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> der drei Klone mit höchster Luciferase-Expression	40
3.3.4	Standardexpression HSE1x-6x- <i>RBCS2</i> der Klone mit höchster Luciferase-Expression	42
3.3.5	Darstellung der Luciferase- Standardexpression HSE1x-6x- <i>RBCS2</i> mit einzelnen Messwerten	44
3.3.6	Hitzeschockexperimente HSE1x-6x- <i>RBCS2</i> , HSE8x- <i>RBCS2</i>	47
3.4	HSE8x Promotorkombinationen - Messung der Basalexpression.....	51
3.5	Hitzeschockmessungen des Promotorkonstrukts HSE8x- <i>RBCS2</i>	55
3.6	Chromatinimmunopräzipitations-Assay	58
3.7	HSE-Promotorkombinationen-HS Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen	59
3.8	tagRFP als neuer Reporter	60
3.8.1	Klonierung des tagRFP Reporters für die Expression im Kerngenom	60
3.8.2	Fluoreszenzmikroskopie des Reporters tagRFP für die nukleäre Expression	62
3.8.3	Plattenlesermessungen Kern-tagRFP	63
3.8.4	Plattenlesermessungen tagRFP - Hitzeschock	66
3.8.5	ImageJ Auswertungen tagRFP Hitzeschock.....	67
3.8.6	FACS Analysen	69
3.8.7	FACS Analysen und Sortierung.....	71
3.8.8	Klonierung tagRFP für die Chloroplasten-Expression	75
3.9	mCherry als Reporter in <i>C. reinhardtii</i>	76
4	Diskussion	79
4.1	Messung der Expressionsraten mittels Luciferase Assay.....	79
4.2	Verbesserte Transgenexpression in <i>C. reinhardtii</i> durch synthetische Hitzeschockelemente	80
4.2.1	Hitzeschock HSE8x- <i>RBCS2</i> und anschließende Kultivierung	83
4.2.2	HSE1x-6x- <i>RBCS2</i> -Verbesserte Basalexpression mit HSE1x- <i>RBCS2</i>	83
4.2.3	Unterschiedliche Hitzeschock-Bedingungen.....	84
4.3	Nachweis der Bindung von HSF1 an synthetische HSEs mittels ChIP-Assay	85

4.4	TagRFP.....	85
4.4.1	TagRFP Plattenlesegerät und ImageJ Auswertungen.....	86
4.4.2	FACS Analyse tagRFP am Gerät LSRFortessa™ der Firma BD	87
4.4.3	Cell Sorting tagRFP am Gerät MoFlo Astrios des Herstellers Beckman	87
4.4.4	TagRFP im Vergleich mit mCherry.....	88
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	89
5	Materialien und Methoden	90
5.1	Materialien.....	90
5.1.1	Medien und Pufferlösungen	90
5.1.2	Chemikalien.....	93
5.1.3	Bakterienstämme	95
5.1.4	Algenstämme	95
5.1.5	Enzyme/DNA Größenmarker	95
5.1.6	Antikörper	97
5.1.7	Plasmide	97
5.1.8	Kit Systeme für die DNA Aufreinigung	99
5.1.9	Oligonucleotide	100
5.1.10	Geräte.....	101
5.2	Methoden.....	103
5.2.1	Restriktionsverdau und Auftrennung auf dem Agarosegel	103
5.2.2	Isolierung von Plasmid DNA	103
5.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA Fragmenten aus dem Agarosegel.....	103
5.2.4	Polymerasekettenreaktion mithilfe der Taq Polymerase	103
5.2.5	Dephosphorylierung von Plasmid DNA.....	104
5.2.6	Ligation von Plasmidvektor mit DNA Insert	104
5.2.7	Blunt ends mittels Klenow	104
5.2.8	Fusion zweier Plasmide mittels <i>Cre Rekombinase</i> Reaktion.....	105
5.2.9	Herstellung kompetenter <i>DH5α</i> -Bakterienzellen mittels Inoue Methode	106
5.2.10	Transformation in <i>DH5α</i> Bakterienzellen.....	106
5.2.11	Transformation in <i>Pir1</i> Bakterienzellen	106
5.2.12	Cryokonservierung von Bakterienzellen	107
5.2.13	Sequenzierung.....	107
5.2.14	Kultivierung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	107

5.2.15	Transformation von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	107
5.2.16	Zellzahlbestimmung mittels Thomakammer	108
5.2.17	Linearisierung von Plasmid DNA für die Algentransformation	108
5.2.18	Konzentrationsbestimmung der linearisierten DNA.....	108
5.2.19	Isolierung von DNA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	108
5.2.20	Genomische PCR- <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	109
5.2.21	Erstellen der Luciferase Standardgeraden	109
5.2.22	Kinetikmessungen Luciferase.....	110
5.2.23	Plattenlesermessungen Algenklone.....	110
5.2.24	Absorbtionsmessungen Plattenleser	110
5.2.25	Fluoreszenzmikroskopie.....	111
5.2.26	Auswertung der Fluoreszenz mit ImageJ	111
5.2.27	Hitzeschock	111
5.2.28	Fluorescence Activated Cell Sorting.....	112
5.2.29	ChIP Assay	112
Literaturverzeichnis.....		XVI
Anhang		XXXV
Eidesstattliche Erklärung.....		XXXIX

Abkürzungsverzeichnis

Ab Puffer	Assay Puffer (Luciferase Assay)
ARG7	Arginin7 Gen
Amp	Ampicillin
Aph	Aminoglykosid- Phosphotransferase
Betain	N,N,N,- Trimethylglycin- Monohydrat
BFP	Blau Fluoreszierendes Protein
Bla	Ampicillinresistenzgen
<i>ble</i>	Resistenz gegen Bleomycin Antibiotika (z.b. Zeocin)
Bp	Basenpaare/base pairs
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>crLuc</i>	Kern Codon-optimierte Luciferase
CTZ	Coelenterazin
Cpluc	Chloroplasten Codon-optimierte Luciferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotriditriphosphat
Eb Puffer	Enzympuffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
for	forward Primer
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GRAS	Generally regarded as safe
HR	Homologe Rekombination
HS	Hitzeschock
HSE8x	Heat Shock Element achtfach
HSF	Heat Shock Transkriptionsfaktor
Hsp	Heat Shock Promotor

<i>HSP70A</i>	Heat Shock Protein 70A
Hyg	Hygromycin
In	Intron
LB	Lysogeny Broth Medium
<i>lox</i>	locus of crossing over
luc	Luciferase
miRNA	Mikro RNA
mM	millimolar
NHJ/NHR	Non homologous end joining-nicht homologe Rekombination
ORI	Origin of replication
PBCV1	<i>Paramecium bursaria Chlorella Virus 1</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pMCI	Plasmid am Management Center Innsbruck kloniert
pMS	Plasmid von Michael Schroda
pXX	Plasmide an der Universität Regensburg kloniert
<i>RBCS2</i>	Gen der kleinen Ribulose 1,5- bisphosphat- Carboxylase- Oxygenase
(tag)RFP	Rot fluoreszierendes Protein
rev	reverse Primer
RLU	Relative Licht Einheiten (relative light units)
Rluc	Renilla reniformis Luciferase
RNA	Ribonucleinsäure
ROI	Region of interest (bei ImageJ)
rpm	Rotationen pro min
Rubisco	Ribulose 1,5- bisphosphat- Carboxylase- Oxygenase
siRNA	Small interfering RNA
SOC	Super optimal broth Medium mit Glucose
Taq	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAP	Tris-Acetat Phosphat-Medium
TE	Tris-EDTA-Puffer
TCP	Total Cell Protein
TSP	Total Soluble Protein
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethynhydrochlorid
3'UTR	Untranslated Region
WT	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein-gelb fluoreszierendes Protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellaufbau und Expressionswege von <i>C. reinhardtii</i> (Griesbeck et al., 2006)	2
Abbildung 2: Cre loxP Klonierung nach (Heitzer et al., 2007b; Liu et al., 1998)	13
Abbildung 3: Reaktion <i>Renilla reniformis</i> Luciferase (Matthews et al., 1977)	22
Abbildung 4: Plasmid mit <i>PBCVI</i> Viruspromotor	31
Abbildung 5: Fusionsplasmid mit <i>PBCVI</i> Viruspromotor und Arg7	32
Abbildung 6: Fusionsplasmid mit HSE8x-RBCS2 Promotor und Arg7	35
Abbildung 7: Plasmid mit RBCS2 Promotor	52
Abbildung 8: Plasmid mit HSE8x Promotor	52
Abbildung 9: ChIP Assay mit pMCI77- HSE8x-RBCS2	58
Abbildung 10: tagRFP Plasmid	61
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen tagRFP (Kothgassner, 2013)	62
Abbildung 12: FACS Histogramm tagRFP Klone	69
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopisches Vergleichsbild zum FACS tagRFP	70
Abbildung 14: WT Stamm-Negativkontrolle Hintergrundsignal tagRFP Fluoreszenz	72
Abbildung 15: tagRFP Fluoreszenz FACS_Promotor HSE8x_RBCS2	73
Abbildung 16: tagRFP Fluoreszenz FACS_Promotor HSP70A_RBCS2	73
Abbildung 17: Fluoreszenz von toten Zellen im Spektralbereich tagRFP	75
Abbildung 18: <i>ble2A</i> mCherry Plasmid	76
Abbildung 19: <i>blemCherry</i> Plasmid	77
Abbildung 20: <i>ble2A</i> tagRFP Plasmid	77
Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahme <i>ble2AmCherry</i> _pMCI108	78
Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahme <i>blemCherry</i> _pMCI109	78
Abbildung 23: Chromatinstadien bei <i>HSP70A</i> unter Einfluss des HSF1 nach (Strenkert et al., 2011b)	82
Abbildung 24: 50 bp Marker (Thermo Scientific, 2015b)	96
Abbildung 25: 1 kbp Marker (Thermo Scientific, 2015a)	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rekombinante therapeutische Proteine aus <i>C. reinhardtii</i> (Specht et al., 2010; Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Almaraz-Delgado et al., 2014).....	7
Tabelle 2: Selektionsmarker in <i>C. reinhardtii</i> (Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Mussnug, 2015).....	15
Tabelle 3: Promotoren im Kerngenom von <i>C. reinhardtii</i> (Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Mussnug, 2015).....	17
Tabelle 4: Reportergene im Kerngenom von <i>C. reinhardtii</i> (Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Mussnug, 2015) ..	21
Tabelle 5: Vergleich der Fluoreszenzproteine (Merzlyak et al., 2007)	25
Tabelle 6: Weitere Fluoreszenzproteine in <i>C. reinhardtii</i> (Nagai et al., 2002; Rizzo et al., 2004; Shaner et al., 2004; Kremers et al., 2006; Markwardt et al., 2011; Lam et al., 2012; Rasala et al., 2013; Lauersen et al., 2015) ..	26
Tabelle 7: Promotoren des Chlorella Virus <i>PBCVI</i>	30
Tabelle 8: Plasmide HSE1x-6x- <i>RBCS2</i> und HSE8x- <i>RBCS2</i>	34
Tabelle 9: Werte der Messung 1 Standardexpression HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i>	36
Tabelle 10: Klone Messung 1 Standardexpression.....	37
Tabelle 11: Werte der Messung 2 Standardexpression HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i>	38
Tabelle 12: Klone Messung 2 Standardexpression.....	38
Tabelle 13: Werte der Messung 3 Standardexpression HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i>	39
Tabelle 14: Klone Messung 3 Standardexpression.....	40
Tabelle 15: Klonierung HSE8x	51
Tabelle 16: Bedingungen Hitzeschockexperimente	55
Tabelle 17: Klonierung von tagRFP	60
Tabelle 18: Ergebnisse FACS tagRFP Klone	70
Tabelle 19: Klonierung mCherry	78
Tabelle 20: Hitzeschockelemente im Promotor HSP70A von <i>C. reinhardtii</i> (Lodha et al., 2005)	80
Tabelle 21: Plasmide für Fusion und Grundplasmide.....	XXXV
Tabelle 22: Plasmide mit Viruspromotoren	XXXV
Tabelle 23: Fusionsplasmide mit Viruspromotoren	XXXV
Tabelle 24: Kontrollfusionsplasmide	XXXVI
Tabelle 25: Plasmide mit HSE8x	XXXVI
Tabelle 26: Fusionsplasmide mit HSE8x.....	XXXVI
Tabelle 27: Plasmide mit Kern tagRFP	XXXVI
Tabelle 28: Plasmide mit Chloroplasten tagRFP.....	XXXVII
Tabelle 29: Plasmide mit HSE1x-6x	XXXVII
Tabelle 30: Fusionsplasmide mit HSE1x-6x.....	XXXVII
Tabelle 31: Plasmide mit HSP70A lang.....	XXXVIII
Tabelle 32: Plasmide für Vergleich mCherry/tagRFP	XXXVIII

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Spektren GFP und Chlorophyll (Shimomura et al., 1962)	23
Diagramm 2: tagRFP Fluoreszenzspektrum (Merzlyak et al., 2007).....	24
Diagramm 3: Spektren mCherry nach (Shaner et al., 2004).....	25
Diagramm 4: Standardgerade Renilla Luciferase in TAP, EB, AB mit 5µM CTZ	29
Diagramm 5: Standardgerade Renilla Luciferase in TAP mit 10 µM CTZ.....	30
Diagramm 6: Plattenlesermessungen Chlorellaviruspromotoren.....	33
Diagramm 7: Messung 1 der Standardexpression HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i>	36
Diagramm 8: Messung 2 Standardexpression HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i>	37
Diagramm 9: Messung 3 Standardexpression HSE1x bis 6x- <i>RBCS2</i>	39
Diagramm 10: Messung1 der HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> Standardexpression und davon die Werte der drei höchsten	40
Diagramm 11: Messung2 der HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> Standardexpression und davon die Werte der drei höchsten	41
Diagramm 12: Messung3 der HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> Standardexpression und davon die Werte der drei höchsten	41
Diagramm 13: Messung1 der HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> Standardexpression und davon der höchste Wert.....	42
Diagramm 14: Messung2 der HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> Standardexpression und davon der höchste Wert.....	43
Diagramm 15: Messung3 der HSE1x bis HSE6x- <i>RBCS2</i> Standardexpression und davon der höchste Wert.....	43
Diagramm 16: Verteilung der Einzelklone aus Messung 1-Luc Expression HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	44
Diagramm 17: Verteilung der Einzelklone aus Messung 2-Luc Expression HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	45
Diagramm 18: Verteilung der Einzelklone der drei Messungen-Luc Expression HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	46
Diagramm 19: Hitzeschock Messung 1 HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	48
Diagramm 20: Hitzeschock Messung 2 HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	49
Diagramm 21: Hitzeschock Messung 3 HSE1x-6x- <i>RBCS2</i>	50
Diagramm 22: Luc-Messung 1- HSE8x 20s	53
Diagramm 23: Luc-Messung 2- HSE8x 20s	54
Diagramm 24: HS15min, Lumineszenzkinetik über 4h.....	56
Diagramm 25: HS 30min, Lumineszenzkinetik über 3,5h.....	56
Diagramm 26: Zusammenfassung der Plattenlesermessungen HSE8x	57
Diagramm 27: <i>Screening</i> Counting Time tagRFP	63
Diagramm 28: <i>Screening</i> Counting Time Reproduktion.....	64
Diagramm 29: <i>Screening</i> Lampenintensität 2500-20000 (digitale Schritte) entsprechen 3-4Watt	65
Diagramm 30: <i>Screening</i> Lampenintensität 2500 bis 3500 (digitale Schritte) entsprechen 3-4Watt	65
Diagramm 31: Hitzeschock 40°C für 30 min.....	66
Diagramm 32: Hitzeschock 40°C für 30 min Reproduktion.....	67
Diagramm 33: Intensität tagRFP/Chlorophyll Hitzeschock1 40°C für 30 min	68
Diagramm 34: Intensität tagRFP/Chlorophyll Hitzeschock2 40°C für 30 min	68

1 Einleitung

1.1 Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii gehört zum Reich der Eukaryonten, ist der Klasse der einzelligen Grünalgen zuzuordnen und zählt zur Familie der *Chlamydomonadaceae*. Die Zelle weist eine runde bis ovale Form mit einer Länge von 8-22 µm auf (Imam et al., 1985). Die haploide Zelle besitzt im Kerngenom 17 Chromosomen. Das mit ca. 64% sehr GC-reiche Genom weist eine Größe von 120 Megabasen auf (Grossman et al., 2003). Der 2-4 µm große Kern ist in der Mitte der Zelle situiert und von einer doppelten Kernmembran umgeben (Harris et al., 2009a). Des Weiteren enthält die Zelle in der Nähe des Nukleus den Golgi Apparat sowie das Endoplasmatische Retikulum. Mitochondrien kommen in *C. reinhardtii* in länglicher bis ovaler Form vor. Zur Fortbewegung besitzt der Wildtypstamm zwei Flagellen, welche eineinhalb bis zweimal so lang sind wie die Zelle selbst, und im Basalkörper verankert sind. Das Geißel Axenom besitzt eine 9+2-Struktur in dessen Zentrum sich zwei einzelne Mikrotubuli befinden, welche von einem Zylinder von neun doppelten Mikrotubuli umgeben sind. Die Geißeln sind mit feinen Härchen, bestehend aus einer Kette von Glykoproteinen, ummantelt. Für die Orientierung steht *Chlamydomonas reinhardtii* ein Augenfleck, welcher Carotinoide enthält, zur Verfügung. Zwischen Zellkern und Basalkörper befinden sich zwei Vakuolen, welche von Vesikeln umgeben sind. Fast die gesamte Zelle wird von einem becherförmigen Chloroplasten eingenommen. Dieser dient bei Vorhandensein einer Lichtquelle dem photosynthetischen Wachstum. *C. reinhardtii* kann allerdings auch heterotroph wachsen, wenn in Dunkelheit Acetat als Kohlenstoffquelle vorhanden ist. Die Wildtypzelle ist zusätzlich zur Membran von einer Zellwand umgeben, welche aus hydroxyprolinreichen Glykoproteinen wie Glucose, Mannose, Galaktose und Arabinose besteht und keine Cellulose enthält (Imam et al., 1985). Bei den zumeist für die Transformation verwendeten Mutanten ist diese Zellwand nur teilweise vorhanden, um das Eindringen der DNA in die Zelle zu erleichtern (Monk et al., 1983). Stehen keine geeigneten zellwanddefizienten Mutanten zur Verfügung, wird die Zellwand mit Autolysinlösung enzymatisch entfernt. Dabei handelt es sich um eine Lösung aus lytischen Enzymen, welche bei der Gametogenese durch die beiden *Mating*-Typen freigesetzt werden.

Für die Herstellung und Aufreinigung des Autolysin stehen, unter anderem auf der Website des *Chlamydomonas* Ressource Center, Protokolle bereit (Jaenicke et al., 1987; Waffenschmidt, 2011).

C. reinhardtii teilt sich unter Normalbedingungen durch Zweiteilung. Die Verdoppelungszeit beträgt dabei 6-8 h. Unter Stressbedingungen, Stickstoffmangel und blauem Licht oder Austrocknung des Lebensraums wird die sexuelle Vermehrung induziert (Sager, R., Granick, S., 1954; Huang et al., 2003).

Chlamydomonas reinhardtii dient seit vielen Jahren als Modellorganismus, beispielsweise in den Bereichen Aufbau und Funktion von Flagellen, Photosynthese, Phototaxis und Zell-Zell Erkennung (Harris, 2001). Alle drei Genome, das Kern-, Chloroplasten- und Mitochondriengenom, sind bereits sequenziert und können genetisch manipuliert werden (Maul et al., 2002; Grossman et al., 2003; Merchant et al., 2007). In Abbildung 1 sind der Zellaufbau von *C. reinhardtii* sowie ein Überblick über die möglichen Expressionswege im Kern beziehungsweise im Chloroplasten der Alge schematisch dargestellt. Wie in Abbildung 1 gezeigt ist, kann bei der Kernexpression das Protein ins Medium sezerniert oder im Cytoplasma lokalisiert vorliegen. Bei der Expression im Chloroplastengenom verbleibt das Protein im Organell.

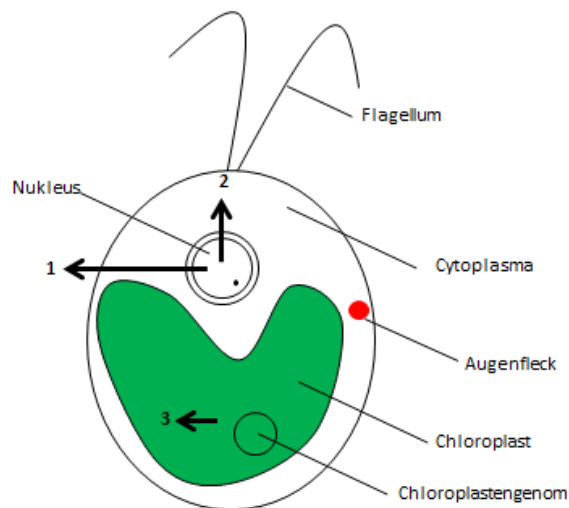


Abbildung 1: Zellaufbau und Expressionswege von *C. reinhardtii* (Griesbeck et al., 2006)

Zellaufbau von *Chlamydomonas reinhardtii* sowie die Expressionswege des Chloroplasten und des Kerngenoms sind ersichtlich. 1 und 2 beschreiben hierbei zum einen die Sekretion des Proteins ins Medium (1) und die im Zytoplasma verbleibenden Proteine unter 2. Im Chloroplasten liegt das Genom in mehreren Kopien vor. Bei der Expression in diesem Organell verbleibt das Protein in der Zelle (3). Im vereinfacht dargestellten Zellaufbau sind zum einen der für die Orientierung wichtige Augenfleck sowie der Chloroplast und der Kern gezeigt.

1.2 Kultivierung und Transformation von *C. reinhardtii*

C. reinhardtii kann wie bereits erwähnt beim Vorhandensein von Licht durch Photosynthese autotroph, in der Dunkelheit mittels Acetat als Kohlenstoffquelle heterotroph und auch mixotroph wachsen. Zumeist wird die Grünalge im Labormaßstab unter Licht in TAP-Medium kultiviert (Hutner et al., 1950; Gorman et al., 1965). Dabei wird eine 50 ml Flüssigkultur bei einer Temperatur von 25°C, 120 rpm und mit einer Lichtquelle kultiviert. Für größere Mengen können die Algen auch in Photobioreaktoren kultiviert werden. Damit die Kulturen über einen längeren Zeitraum gelagert werden können, werden diese zumeist auf TAP- Agar- Platten oder Schrägagar kultiviert. Dies ist deshalb notwendig, da zwar einige Protokolle für die Cryokonservierung von *C. reinhardtii* zur Verfügung stehen, deren Etablierung im Labor allerdings sehr aufwendig ist (Whittaker, 1993; Bodas et al., 1995; Harris et al., 2009a). Um das Kerngenom transformieren zu können, wird häufig die von Kindle 1990 beschriebene Glasperlen-Methode verwendet (Kindle, 1990). Dabei wird DNA mit den Algenzellen, Polyethylenglykol und Glasperlen gevortext. Die dabei entstehenden Scherkräfte machen das Eindringen von DNA in das Kerngenom von *C. reinhardtii* möglich. Die Integration der DNA findet hierbei nicht gerichtet durch Mechanismen der Nicht-homologen Rekombination statt (Debuchy et al., 1989; Kindle, 1998). Es gibt aber auch die Möglichkeit DNA mittels Silikoncarbidkugeln, biolistischen Methoden, *Agrobacterium tumefaciens* gerichteter Transformation, Elektroporation oder Nanopartikeln in die Algenzellen einzubringen. (Boynton et al., 1988; Kindle, 1990; Brown et al., 1991; Dunahay, 1993; Tang et al., 1995; Randolph-Anderson et al., 1998; Kumar et al., 2004; Kim et al., 2014). Anstelle von Glasperlen können auch Silikoncarbidkügelchen verwendet werden. Der Vorteil hiervon ist, dass diese Methode auch mit Wildtypstämmen funktioniert und weniger Zellen beim Vortexen absterben. Allerdings ist das Material kostenintensiv (Kindle, 1990; Dunahay, 1993). Die biolistische Methode wird hierbei zumeist für die Transformation des Chloroplasten verwendet. Dabei werden die mit DNA beladenen Gold- oder Wolframkügelchen in einer unter Vakuum stehenden Kammer mit Heliumdruckstößen beschleunigt. Nachdem eine Berstscheibe durchbrochen wurde, treffen die Kügelchen mit der anhaftenden DNA auf die Petrischale mit den Algenzellen (Boynton et al., 1988). Die Elektroporation kann sowohl bei Wildtypstämmen als auch bei Mutanten verwendet werden und ist aufgrund der geringen Zellmenge, die pro Transformationsansatz benötigt wird, eine gute Alternative zur Glasperlen-Methode (Tang et al., 1995).

Obwohl es auch möglich ist, Transgene in *C. reinhardtii* mit hoher Effizienz mittels *Agrobacterium tumefaciens* einzubringen, findet diese Methode aufgrund der Kosten und aufwendigeren Handhabung selten Anwendung (Kumar et al., 2004; Pratheesh et al., 2014). Infolge der einfachen Durchführbarkeit und des kostengünstigen Materials wird allerdings die Glasperlen-Methode für die Transformation des Kerns zumeist bevorzugt.

1.3 *C. reinhardtii* als Expressionssystem

Die einzellige Grünalge *C. reinhardtii* dient wie bereits beschrieben als Modellorganismus, und somit sind bereits die für die Expression von Transgenen wichtigen Methoden der Transformation des Kern-, Chloroplasten- und Mitochondriengenoms etabliert (Boynton et al., 1988; Kindle, 1990; Remacle et al., 2006). Andere kommerziell verwendete Expressionssysteme wie Hefen, tierische Zellkulturen und *E. coli* weisen sowohl Vor- als auch Nachteile für die Produktion von biotechnologisch relevanten Produkten auf. Tierische Zellkulturen sind beispielsweise stark anfällig für Infektionen und aufgrund der anspruchsvollen Medienzusammensetzung relativ kostspielig in der Kultivierung. *E. coli* ist zwar kostengünstig und schnell zu kultivieren, allerdings spielt bei diesem Expressionssystem die Bildung von *Inclusion Bodies* eine negative Rolle. Diese treten vor allem bei hohen Proteinkonzentrationen und damit verbundener Aggregation der Proteine auf. Die Aufreinigung ist dadurch erschwert, und die Proteine müssen zusätzlich rückgefaltet werden. Außerdem ist *E. coli* als Prokaryont nicht in der Lage, die für viele Produkte der Pharmaindustrie relevanten, posttranslationalen Modifikationen durchzuführen (Baneyx et al., 2004). *C. reinhardtii* kann als eukaryontisches System Modifikationen durchführen, die allerdings von denen anderer Eukaryonten abweichen können. Ob die dadurch entstehenden modifizierten Proteine für eine Anwendung in der Humanmedizin geeignet sind, ist aufgrund der bisher nicht vollständig geklärten Glykosylierungsmuster nicht vorhersehbar (Mamedov et al., 2011; Mathieu-Rivet et al., 2014).

C. reinhardtii wächst mit einer Verdoppelungszeit von etwa 8 h im Vergleich zu anderen, beispielsweise pflanzlichen Kulturen, sehr schnell und bietet außerdem den Vorteil, durch die einfache Medienzusammensetzung kostengünstig kultiviert werden zu können. Die Möglichkeit, auch in Dunkelheit mittels Acetat als Kohlenstoffquelle wachsen zu können, stellt einen weiteren wichtigen Vorteil dar.

Es gibt bisher keine bekannten Viren oder Prionen, welche *C. reinhardtii* befallen, und somit wurde diese Grünalge mit dem GRAS- Status (*generally regarded as safe*) ausgezeichnet (Griesbeck et al., 2006; Gantar et al., 2008; Rosenberg et al., 2008; Harris et al., 2009a). Aufgrund dieser Einstufung wird für manche Anwendungen eine Aufreinigung des in *C. reinhardtii* hergestellten Produkts hinfällig, da die Alge direkt als Pellet gepresst und oral verabreicht werden könnte. Da die Algen zumeist in geschlossenen Systemen kultiviert werden und keine Sporen oder Samen bilden, ist eine Freisetzung in die Natur so gut wie ausgeschlossen. Diese nicht gegebene Gefahr einer Verbreitung ist ebenfalls ein wichtiger Punkt, um die Grünalge als sicher einzustufen (Wang et al., 2008). In Tabelle 1 sind die bisher erfolgreich exprimierten transgenen Produkte in *C. reinhardtii* gezeigt. Die Expression von Fremdproteinen im Chloroplasten stellt dabei den Großteil der Beispiele dar. Grund hierfür ist, dass das Transgen in diesem Genom durch homologe Rekombination eingebracht werden kann. Zusätzlich tritt hierbei kein *Gene Silencing* auf (Eichler-Stahlberg et al., 2009; Rasala et al., 2010). Die Expression im Kerngenom der Alge spielt in dieser Auflistung hingegen eine relativ kleine Rolle. Ein wichtiger Grund dafür sind die in diesem Genom vorherrschenden niedrigen Mengen an rekombinantem Protein. Diese sind vor allem auf das Auftreten von *Silencing* und fehlende starke Promotoren zurückzuführen (Paszkowski et al., 2001). Außerdem findet im Kerngenom die Integration des Transgens wie bereits erwähnt zumeist zufällig durch nicht homologe Rekombination statt (Kindle et al., 1994). Dies führt zu einer nicht gerichteten Integration des Transgens im Genom und somit zu Positionseffekten, welche in weiterer Folge zu *Gene-Silencing* Mechanismen führen können. Durch diesen zufälligen Vorgang kommt es zu einer hohen Variabilität zwischen den einzelnen Transformanten.

Versuche für gezieltes Einbringen von Fremd-DNA durch homologe Rekombination wurden bereits unternommen und umfassen Cre- Rekombinasen (Mägdefrau, 2007), Zink Finger Nukleasen (Sizova et al., 2013), Transcription activator like effector nucleases (TALEN) (Gao et al., 2014) und CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas9 (CRISPR associated protein 9) (Jiang et al., 2014; Greiner, 2014).

Diese Eingriffe ins Genom sind zum Teil toxisch für *C. reinhardtii* und führen teilweise zum Absterben der Zellen. Es konnten zwar bei einzelnen Versuchen erfolgreich gezielte Genstillegungen an definierten Stellen im Genom durchgeführt werden, jedoch konnte eine standardisierte Anwendbarkeit aufgrund der beschriebenen Probleme bisher nicht erreicht werden. Angesichts der möglichen Sekretion des Produkts ins Medium und der damit verbundenen, erleichterten Aufreinigung ist das Kerngenom für manche biotechnologische Produkte eindeutig zu bevorzugen. Die folgende Tabelle zeigt eine Auflistung der bisher erfolgreich hergestellten Fremdproteine in *C. reinhardtii*.

Einleitung

Tabelle 1: Rekombinante therapeutische Proteine aus *C. reinhardtii* (Specht et al., 2010; Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Almaraz-Delgado et al., 2014)

Rekombinantes Protein	Expressionsort	Proteinklasse/Beschreibung	Ausbeute	Referenz
Metallothionein Typ II	Nukleus/Periplasma	Metallbindendes Protein, UV Schutz	Keine Angabe	(Cai et al., 1999)
Δ (1)-Pyrolin-5-Carboxylatsynthetase	Nukleus	Enzym, Cd Bindung	Keine Angabe	(Siripornadulsil et al., 2002)
Antigenes Peptid P57 des pathogenen <i>Rennibacterium salmoninarium</i>	Chloroplast, Nukleus/Periplasma	Antigenes Protein, Einsatz bei Erkrankung in Fischfarmen	Keine Angabe	(Sayre et al., 2001; Leon-Banares et al., 2004)
Antigene Proteine VP19, 24, 26, 28 des Virus der Weißfleckenkrankheit	Chloroplast/Nukleus/Periplasma/Cytoplasma	Antigenes Protein, Einsatz bei Erkrankung in Shrimpsfarmen	Keine Angabe	(Sayre et al., 2001; Surzycki et al., 2009)
Maul- und Klauenseuchevirus VP1 Protein fusioniert mit der Cholera Toxin B Untereinheit	Chloroplast	Antigenes Protein, Einsatz bei Erkrankung in Tierzucht	3-4% TSP	(Sun et al., 2003)
Anti-Glycoprotein D des Herpes Simplex Virus-Antikörper (Humaner IgA)	Chloroplast	Antikörper, gegen Herpes Simplex Virus	Keine Angabe	(Mayfield et al., 2003)
Allophycocyanin	Chloroplast	Pigment, Krebstherapie	2-3% TSP	(Su et al., 2005)
Humanes Metallothionein-2	Nukleus	Metallbindendes Protein, UV Schutz	Keine Angabe	(Zhang et al., 2005)
Anti-Hase IgG Antikörper fusioniert mit Luciferase	Nukleus/Medium	Antikörper/Enzym	Keine Angabe	(Griesbeck et al., 2006)
Humaner Tumornekrosefaktor-Apoptose induzierender Ligand	Chloroplast	Ligand, Tumornekrose	0,43-0,67% TSP	(Yang et al., 2006)

Einleitung

Tabelle 1 Fortsetzung: Rekombinante therapeutische Proteine aus *C. reinhardtii* (Specht et al., 2010; Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Almaraz-Delgado et al., 2014)

Rekombinantes Protein	Expressionsort	Proteinklasse/Beschreibung	Ausbeute	Referenz
Rinderserum Amyloid-M-SAA	Chloroplast	Serumprotein, zur Verstärkung der Abwehr- Darmaufbau	3-5% TSP	(Manuell et al., 2007)
Klassischer Schweine-Fieber Virus E2 -virales Protein	Chloroplast	Antigenes Protein, Einsatz bei Erkrankung in Schweinefarmen	1,5-2% TSP	(He et al., 2007)
GAD65-Humane Glutaminsäure-decarboxylase 65	Chloroplast	Antigenes Protein, Diabetes	0,25-0,3% TSP	(Wang et al., 2008)
Humanes Erythropoietin	Nukleus	Hormon, Anämie	100 µg/l Kultur	(Eichler-Stahlberg et al., 2009)
Anti-Anthrax protektives Antigen 83 Antikörper	Chloroplast	Antikörper, Anthrax	0,01% Algentrockenmasse	(Tran et al., 2009)
IBDV-VP2, Infektiöser Bursal Virus VP2 Protein	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Hühnerfarmen	0,8-4% Total Cell protein (TCP)	(Surzycki et al., 2009)
IPNV-G Infektiöses Haematopoetisches Nekrosevirus	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Fischfarmen	<0,5% TCP	(Surzycki et al., 2009)
IPNV-VP2 Infektiöses Pankretisches Nekrosevirus	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Fischfarmen	<0,3% TCP	(Surzycki et al., 2009)
VP2 Protein	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Hühnerfarmen	0,1-1% TCP	(Surzycki et al., 2009)
IPNV-VP2 SBC Infektiöses pankretisches Nekrosevirus	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Hühnerfarmen	0,2-1% TCP	(Surzycki et al., 2009)
Quorum Sensing regulatorisches Gen (LecA) p57	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Hühnerfarmen	<0,5% TCP	(Surzycki et al., 2009)

Einleitung

Tabelle 1 Fortsetzung: Rekombinante therapeutische Proteine aus *C. reinhardtii* (Specht et al., 2010; Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Almaraz-Delgado et al., 2014)

Rekombinantes Protein	Expressionsort	Proteinklasse/Beschreibung	Ausbeute	Referenz
PCV2, Schweine Circovirus Typ 2	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Schweinefarmen	0,2-0,9% TCP	(Surzycki et al., 2009)
VP-2C	Chloroplast	Einsatz bei Erkrankung in Hühnerfarmen	<0,5% TCP	(Surzycki et al., 2009)
VP28 des Virus der Weißfleckenkrankheit	Chloroplast	Einsatz in Shrimpsfarmen bei Erkrankung	21-0,2% TCP	(Surzycki et al., 2009)
GBSS-AMA1-Malaria Antigen	Nukleus	Antigen, Malaria	Keine Angabe	(Dauvillée et al., 2010)
GBSS-MSP1-Malaria Antigen	Nukleus	Antigen, Malaria	Keine Angabe	(Dauvillée et al., 2010)
D2-CTB Fibronektin-Bindedomäne von <i>Staphylococcus aureus</i> fusioniert mit der Cholera toxin B Untereinheit	Chloroplast	Antigenes Protein, oraler Impfstoff gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	0,7% TSP	(Dreesen et al., 2010)
Humanes Fibronektin (Domäne 10 und 14)	Chloroplast	Antikörper	14FN3: 3% TSP 10FN3: detektierbar	(Rasala et al., 2010)
Interferon β	Chloroplast	Cytokin, Multiple Sklerose Behandlung	detektierbar	(Rasala et al., 2010)
Proinsulin	Chloroplast	Hormon, Diabetes Typ1	detektierbar	(Rasala et al., 2010)
Humaner Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Isoform 121 (VEGF)	Chloroplast	Hormon, Lungenemphysem, Erektionsstörungen, Depression	2% TSP	(Rasala et al., 2010)
High mobility group protein B1 (HMGB1)	Chloroplast	Cytokin, Wundheilung und Verstärkung von Antikrebsmitteln	2,5% TSP	(Rasala et al., 2010)

Einleitung

Tabelle 1 Fortsetzung: Rekombinante therapeutische Proteine aus *C. reinhardtii* (Specht et al., 2010; Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Almaraz-Delgado et al., 2014)

Rekombinantes Protein	Expressionsort	Proteinklasse/Beschreibung	Ausbeute	Referenz
acrV2 und vapA2, Antigene des Fischpathogens <i>Aeromonas salmonicida</i>	Chloroplast	Antigen, Einsatz in Fischfarmen bei Erkrankung	0,8% und 0,3% TSP	(Michelet et al., 2011)
<i>E. coli</i> Phytasegen (appA)	Chloroplast	Enzym, Futtermittelzusatz z.B. bei Geflügel	Keine Angabe	(Yoon et al., 2011)
Pfs25 und Pfs28, Oberflächenproteine von <i>Plasmodium falciparum</i>	Chloroplast	Antigen, Malaria	0,5 und 0,2% TSP	(Gregory et al., 2012)
β -1,4-Endoxylanase	Nukleus	Enzym, Futtermittelzusatz z.B. bei Geflügel, Papierindustrie, Bäckerei	0,25% TSP	(Rasala et al., 2012)
E7 des Humanen Papillomavirus-16 (HPV16)	Chloroplast	Antigen, Impfstoff gegen Gebärmutterhalskrebs	0,12% TSP	(Demurtas et al., 2013)
Xylanase, α -Galactosidase, Phytase, Phosphatase	Chloroplast	Enzym, Futtermittelzusatz z.B. bei Geflügel, Papierindustrie, Bäckerei, Galactase bei Morbus Fabry-Verdauungsstörungen	Keine Angabe	(Georgianna et al., 2013)
CtxB-Pfs25- <i>Plasmodium falciparum</i> Oberflächenprotein 25 fusioniert mit β -Untereinheit des Cholera Toxin von <i>Vibrio Cholera</i>	Chloroplast	Antigen, Malaria	0,09% TSP	(Gregory et al., 2013)
Selenoprotein Sep15	Nukleus	Nahrungsmittelzusatz	detektierbar	(Hou et al., 2013)
Pfs45 und Pfs 48 Oberflächenproteine von <i>Plasmodium falciparum</i>	Chloroplast	Antigen, Malaria	Keine Angabe	(Jones et al., 2013)

Einleitung

Tabelle 1 Fortsetzung: Rekombinante therapeutische Proteine aus *C. reinhardtii* (Specht et al., 2010; Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Almaraz-Delgado et al., 2014)

Rekombinantes Protein	Expressionsort	Proteinklasse/Beschreibung	Ausbeute	Referenz
Anti-CD22-ETA-Immunotoxin gegen B-Zell Lymphom	Chloroplast	Immunotoxin, Krebstherapeutikum gegen B-Zell Lymphom	Keine Angabe	(Tran et al., 2013b)
Anti-CD22-Gelonin-Immunotoxin gegen B-Zell Lymphom	Chloroplast	Immunotoxin, Krebstherapeutikum gegen B-Zell Lymphom	0,1-0,3%TSP	(Tran et al., 2013a)
V _H H Antitoxine gegen das Neurotoxin von <i>Clostridium botulinum</i>	Chloroplast	Antigen bindende Proteine, gegen <i>Chlostridium botulinum</i> Infektion	5% TSP	(Barrera et al., 2015)

In den beiden genannten Publikationen von Rasala und Kollegen 2010 sowie Dreesen und Kollegen 2010 wurde gezeigt, dass es möglich ist, zumindest im Chloroplasten von *C. reinhardtii*, therapeutisch wirksame Proteine zu produzieren. Ein sehr interessanter Aspekt hierbei ist der Ansatz, orale Impfstoffe in Form von Algenpellets herzustellen (Dreesen et al., 2010; Rasala et al., 2010). Diese Vakzine sind zudem bei Raumtemperatur stabil. Aufgrund des GRAS-Status können die Pellets ohne weitere Aufreinigungsschritte verabreicht werden. Eine mögliche künftige Anwendung von *C. reinhardtii* als Expressionssystem könnte somit in der Herstellung von oralen Impfstoffen oder Allergenen, welche für die Hyposensibilisierung eingesetzt werden, liegen (Petrovsky et al., 2004; Brehler et al., 2013). *C. reinhardtii* könnte bei der Allergenherstellung neben dem sehr vorteilhaften GRAS-Status auch den Nutzen erfüllen, dass Bestandteile der Alge als Adjuvans dienen könnten und somit die Wirkung verstärkt wird (Petrovsky et al., 2004).

1.4 Steigerung der Expressionsrate im Kerngenom von *C. reinhardtii*

Um die Expression im Kerngenom zu steigern, wurden bisher unterschiedliche Ansätze verfolgt. Da dieses Genom sehr GC-reiche Sequenzen aufweist (Heitzer et al., 2007a), wurden im ersten Schritt Marker- und Reportergene an die Codon Usage der Grünalge angepasst (Fuhrmann et al., 1999; Shao et al., 2008). Dadurch konnte eine Expression des Transgens erreicht werden, wobei die Expressionsraten allerdings nach wie vor gering waren. Deshalb war es auch wünschenswert, starke, möglichst induzierbare Promotoren zu finden. Diese sollten durch optimierte Transkriptionsregulation und damit verbundener Expressionssteigerung die Ausbeute erhöhen. Außerdem wurde Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen geschnitten und in linearisierter Form für die Transformation verwendet. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, das Konstrukt intakt ins Genom zu integrieren. Die in Abbildung 2 gezeigte Cre/loxP Rekombination ermöglicht die Fusion von zwei Plasmiden und erleichtert somit das simultane Einbringen von Marker und Zielgenen. Die Ausbeute kann gesteigert werden, da dadurch wesentlich höhere Coexpressionsraten erzielt werden als bei Transformation der Selektionsmarker und des Zielgens auf unterschiedlichen Plasmiden (Heitzer et al., 2007b).

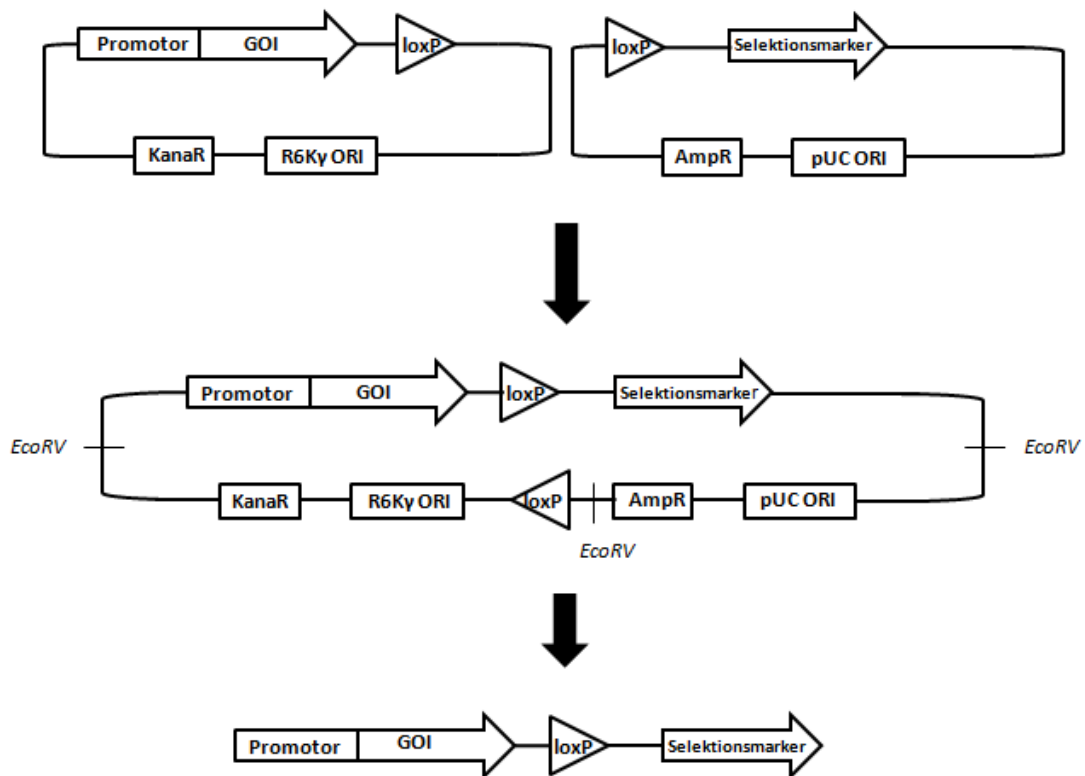


Abbildung 2: Cre loxP Klonierung nach (Heitzer et al., 2007b; Liu et al., 1998)

Gezeigt ist der Vorgang der Cre loxP Rekombination in *C. reinhardtii*. Dabei werden zwei Plasmide verwendet, die jeweils die loxP Erkennungssequenz für das Enzym Cre Rekombinase enthalten. Eines dieser Plasmide enthält den Marker für die Selektion in *C. reinhardtii*, das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin (*AmpR*) als Selektionsmarker in *E. coli* und den *puc* origin of replication (*pUC ORI*) für bestimmte *E. coli* Stämme. Das zweite Plasmid enthält das Gene of interest (*GOI*), einen Promotor für die Expression in *C. reinhardtii*, ein Gen für die Resistenz gegen Kanamycin für die Selektion in *E. coli* und den *R6Ky* Replication Ori für bestimmte *E. coli* Stämme (*R6Ky ORI*). Das Enzym Cre Rekombinase erkennt hierbei die beiden loxP Sites auf den unterschiedlichen Plasmiden, schneidet die DNA Sequenz an dieser Stelle und ligiert die beiden Plasmide miteinander, sodass ein Fusionsplasmid entsteht, welches die Features von beiden Ursprungs-Plasmiden enthält. Die beiden verwendeten Vektoren sind dabei so kloniert, dass wie oben dargestellt die Restriktionsenzymschnittstelle *EcoRV* dazu verwendet werden kann das zirkuläre Plasmid zu linearisieren.

Eichler-Stahlberg und Kollegen stellten 2009 fest, dass das Einbringen von endogenen Intronsequenzen in die Expressionskassette eine Steigerung der Transgenausbeute bewirkt. Als Beispiel wurden dabei eine oder mehrere Kopien des Intron des *RBCS2* Gens verwendet. Die Messung der Expressionsraten ergab, dass die Verwendung von allen drei *RBCS2*-Introns in ursprünglicher Reihenfolge die Expression eindeutig steigern kann (Eichler-Stahlberg et al., 2009).

1.5 Selektionsmarker in *C. reinhardtii*

Um die transformierten Algenklone zu selektieren, stehen bereits einige Marker zur Verfügung. Dies sind vor allem Gene, welche eine Resistenz gegenüber Antibiotika und Herbiziden gewährleisten. Hierzu zählen beispielsweise Gene für die Resistenz gegen Spectinomycin, Zeocin, Paromo- und Hygromycin (*aadA*, *ble* und *aphVII/VIII*). Bei der möglichen biotechnologischen Anwendung der in *C. reinhardtii* hergestellten Proteine ist eine Antibiotikazugabe möglichst zu verhindern. Dies ist gegeben durch die Verwendung von auxotrophen Mutantenstämmen, bei denen ein Defekt in bestimmten Stoffwechselwegen beispielsweise in der Argininsynthese vorliegt. Dieses Defizit wird vor der Transformation durch Zugabe der jeweiligen Stoffe ins Medium kompensiert. Beispiele hierfür sind die Arginin-, die Nitrat-, die Thiamin- oder die Nicotinamid Prototrophie (*ARG7*, *NIA1*, *THI10* und *NIC7*) (Debuchy et al., 1989; Ferris, 1995; Kindle, 1998). Eine Liste der bisher zumeist verwendeten Selektionsmarker im Kerngenom von *C. reinhardtii* ist in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle 2: Selektionsmarker in *C. reinhardtii* (Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Mussnug, 2015)

Marker	Beschreibung	Referenz
<i>ARG7</i>	Arginin Prototrophy	(Debuchy et al., 1989)
<i>NIT1 (NIA1)</i>	Nitrat Prototrophy	(Kindle et al., 1989)
<i>oeo-1</i>	Sauerstoff Enhancer Protein	(Mayfield et al., 1990)
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase	(Hall et al., 1993)
<i>CRY1-1</i>	Resistenz gegen Cryptopleurin/Emetin	(Nelson et al., 1994)
<i>NIC7</i>	Nicotinamid Prototrophy	(Ferris, 1995)
<i>THI-10</i>	Thiamin Prototrophy	(Ferris, 1995)
<i>cat</i>	Resistenz gegen Chloramphenicol	(Tang et al., 1995)
<i>ble</i>	Resistenz gegen Zeocin	(Stevens et al., 1996; Lumberras et al., 1998)
<i>PPX1</i>	Resistenz gegen Herbizide	(Randolph-Anderson et al., 1998)
<i>aphA-6</i>	Resistenz gegen Kanamycin/Amikacin	(Bateman et al., 2000)
<i>act-2</i>	Resistenz gegen Cycloheximid	(Stevens et al., 2001)
<i>aphVIII</i>	Resistenz gegen Paromomycin/Kanamycin	(Sizova et al., 2001)
<i>ALS</i>	Resistenz gegen Sulfometuronmethyl	(Kovar et al., 2002)
<i>aph7''</i>	Resistenz gegen Hygromycin B	(Berthold et al., 2002)
<i>ARG9</i>	Plastitäres N-Acetyl-ornithinaminotransferase	(Remacle et al., 2009)
<i>GAT</i>	Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat	(Brueggeman et al., 2014; Jiang et al., 2014)
<i>PDS1</i>	Resistenz gegen Norflurazon	(Jiang et al., 2014)
<i>TETX</i>	Resistenz gegen Tetrazyklin	(Garcia-Echauri et al., 2015)

Zudem gibt es einige Selektionsmarker für Mutanten des Photosynthese-Apparates, welche für die Selektion im Chloroplastengenom verwendet werden. Diese sind in einem Review von Mussnug 2015 zusammengefasst (Mussnug, 2015).

1.6 Promotorsysteme in *C. reinhardtii*

Im Unterschied zu anderen, konventionell verwendeten Expressionssystemen, in welchen Viruspromotoren für die erhöhte Expression herangezogen werden, ist dies bei *C. reinhardtii* nicht möglich, da es bisher keine bekannten Viren gibt, welche diese Grünalge befallen (Tabor et al., 1985; Battra et al., 1990; Griffiths et al., 1997; Wurm et al., 1999; Ruecker et al., 2008). Auch pflanzenspezifische Viruspromotoren, wie der Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und der Simian Virus 40 Promotor (SV40), führten bisher nicht zur gewünschten Expressionssteigerung in der Alge. Der Hitzeschockpromotor *HSP70A* in Kombination mit jenem der kleinen Untereinheit von Ribulose Bisphosphat Carboxylase - *RBSC2* ist die bisher stärkste verwendete Promotorkombination im Kerngenom der Grünalge (Stevens et al., 1996; Schroda et al., 2000). Man geht davon aus, dass der Hitzeschock- Promotor *HSP70A* hierbei wahrscheinlich durch Histonmodifikationen eine verstärkte Öffnung des Chromatins bewirkt. Der *RBSC2*-Promotor wurde ausgewählt, da *RBSC2* eines der am stärksten exprimierten Gene in *Chlamydomonas reinhardtii* darstellt (Lodha et al., 2005). Weitere starke Promotoren sind beispielsweise jener der Nitratreduktase (*NIT1*) und Cytochrom (*Cyc6*), welche durch Nitrat beziehungsweise Kupfer induziert werden können und somit der Genstilllegung entgegenwirken. In Tabelle 3 sind die bisher für die Transgen- und Reportergenexpression im Kerngenom von *C. reinhardtii* verwendeten Promotoren zusammengefasst.

Tabelle 3: Promotoren im Kerngenom von *C. reinhardtii* (Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Mussnug, 2015)

Promotor	Gen	Referenz
<i>β-2-TUB</i>	β-2-Tubulin	(Brunke et al., 1984; Davies et al., 1992)
<i>SV40</i>	Simian Virus 40	(Hasnain et al., 1985; Ladygin et al., 2002)
<i>LHCBM6</i>	<i>LHCBM6</i>	(Blankenship et al., 1992)
<i>nos</i>	Nopalin Synthase aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(Hall et al., 1993)
<i>RBCS2</i>	Untereinheit von Ribulosebisphosphat-carboxylase	(Kozminski et al., 1993; Stevens et al., 1996)
<i>CaMV</i>	Cauliflower Mosaic Virus 35S	(Tang et al., 1995; Kumar et al., 2004; Ruecker et al., 2008)
<i>Ca1</i>	Gene, welche für Kohlendioxid Anhydrase codieren	(Villand et al., 1997)
<i>NIA1/NIT1</i>	Nitratreduktase	(Ohresser et al., 1997; Loppes et al., 1999)
<i>COP</i>	Chlamyopsin	(Fuhrmann et al., 1999)
<i>CAH1</i>	Carbon Anhydrase	(Kucho et al., 1999; Ferrante et al., 2011)
<i>HSP70A</i>	Hitzeschockprotein 70A	(Schroda et al., 2000)
<i>psaD</i>	Photosystem I Komplexprotein	(Fischer et al., 2001)
<i>GPXH (GPX5)</i>	Glutathion Peroxidase	(Leisinger et al., 2001)
<i>CPX1</i>	Coproporphyrinogen Oxidase	(Quinn et al., 2003)
<i>Cyc6</i>	Cytochrom c ₆	(Quinn et al., 2003)
<i>CHOP2</i>	Channelopsin	(Fuhrmann et al., 2004)
<i>METE</i>	Vitamin B12	(Croft et al., 2005; Helliwell et al., 2014)
<i>DtRBCS</i>	RBCS Promotor aus <i>Dunaliella tertiolecta</i>	(Walker et al., 2005)
<i>HSP70A/RBCS3</i>	RBCS3 aus <i>Volvox Carterii</i>	(Hallmann et al., 2006)
<i>ATX1</i>	Eisen induzierbares Promotorelement	(Fei et al., 2007)
<i>C3</i>	C3	(Voytsekh et al., 2008)
<i>FEA1 (H43)</i>	Fea1	(Fei et al., 2009; Baba et al., 2011)
<i>FTR1</i>	Eisentransporter	(Fei et al., 2010)
<i>FDX5</i>	Ferredoxin	(Lambertz et al., 2010)
<i>HYDA1</i>	Fe-Fe-Hydrogenase-Isoform1	(Pape et al., 2012)
<i>LIP</i>	Promotor aus <i>Dunaliella</i>	(Park et al., 2013)
<i>NAB1</i>	Nukleinsäure-bindendes-Protein	(Berger et al., 2014)
<i>FOX1</i>	Multi-KupferOxidase	(Deng et al., 2014)
<i>LHCBM9</i>	LHCBM9	(Grewe et al., 2014; Sawyer et al., 2015)
<i>SQD2</i>	Sulphoquinovosyldiacylglycerol 2	(Iwai et al., 2014)
<i>ARG7</i>	Argininen	(Specht et al., 2015)

Die Promotoren welche für die Expression von Reportern und Transgenen im Chloroplasten verwendet werden sind in einem Review von Mussnug 2015 zusammengefasst (Mussnug, 2015).

1.7 Hitzeschockantwort in *C. reinhardtii*

Die Hitzeschockantwort wird in eukaryontischen Zellen primär auf Transkriptionslevel reguliert. Dabei dienen Hitzeschockproteine, welche durch Hitzeschockgene kodiert werden, als molekulare Chaperone und helfen der Zelle dabei, die Schäden durch Umwelteinflüsse, wie Hitze, Trockenheit und Schwermetallbelastung gering zu halten. Hitzeschockproteine werden aufgrund ihrer molekularen Masse in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Diese werden bezüglich ihres Molekulargewichts mit kleinen HSPs, HSP40s, HSP60s, HSP70s und HSP100s bezeichnet (Bukau et al., 2006; Hartl et al., 2011). Im Fall von *Chlamydomonas reinhardtii* ist das Hitzeschockprotein 70A (*HSP70A*) eines der wichtigsten dieser Proteinklasse. Der Promotor von *HSP70A* enthält nahe der TATA Box cis regulierte Promotorelemente, welche als Hitzeschockelemente (HSEs) bezeichnet werden. Diese kommen in eukaryontischen Zellen zumeist in wiederholter Form vor und weisen den Konsensus 5'nGAAn3' auf (Schöffl et al., 1998; Schulz-Raffelt et al., 2007). Bei *C. reinhardtii* ist diese Sequenz allerdings in abgewandelter Form vorhanden. So kommt hierbei beispielweise auch die Form 5'nGACn3' häufig vor (Lodha et al., 2005). Es sind in dieser Grünalge zwei Hitzeschockfaktoren bekannt: der Hitzeschockfaktor1 HSF1 und der Hitzeschockfaktor2 HSF2 (Schulz-Raffelt et al., 2007). Der Hitzeschockfaktor1 spielt dabei die primäre Rolle in der Hitzeschockantwort und wird in *C. reinhardtii* unter Normalbedingungen schwach exprimiert und ist unter Hitzeeinfluss induzierbar. Hitzeschockfaktoren, so auch der HSF1 in *C. reinhardtii*, bestehen aus drei Domänen, einer Oligomerisierungsdomäne, einer C-terminalen Transaktivatordomäne und einer N-terminalen DNA-Bindedomäne (Treuter et al., 1993; Damberger et al., 1994; Schöffl et al., 1998; Peteranderl et al., 1999). Je nach Aufbau werden die Hitzeschockfaktoren in drei Klassen (A, B und C) unterteilt. Diese unterscheiden sich durch den Aufbau der Oligomerisations- und der Transaktivatordomäne (Nover et al., 2001). Charakteristisch für die Klasse A sind eine zusätzliche hydrophobe Wiederholung und drei Wiederholungen bestehend aus sieben AS zwischen den hydrophoben Bereichen der Oligomerisationsdomäne (Nover et al., 1996; Schöffl et al., 1998). HSF1 aus *C. reinhardtii* hat eine hohe Ähnlichkeit zu pflanzlichen Klasse A HSF.

Dies konnte durch einen Vergleich der AS-Sequenz und des Aufbaus der DNA Bindedomänen unterschiedlicher HSF bestätigt werden (Nover et al., 1996; Schulz-Raffelt et al., 2007). Zusätzlich verfügt der HSF1 der Grünalge über die potentielle Kernlokalisierungssequenz RRKRR (Schulz-Raffelt et al., 2007).

Durch die Hyperphosphorylierung kann der HSF1 in *C. reinhardtii* verstärkt an die Hitzeschockelemente binden.

Diese Bindung bewirkt die erhöhte Expression von Hitzeschockgenen und in weiterer Folge die Anreicherung von Hitzeschockproteinen (Nover et al., 2001; Schulz-Raffelt et al., 2007; Schmollinger et al., 2010). *HSP70A* interagiert in *C. reinhardtii* konstitutiv mit HSF1 (Schulz-Raffelt et al., 2007). Im Gegensatz zu anderen HSFs, wie beispielsweise jenen von höheren Pflanzen, ist das Umwandeln von einer monomeren in eine trimere Struktur durch Stresseinfluss bei *C. reinhardtii* nicht notwendig, da HSF1 konstitutiv als Trimer vorliegt und durch Hyperphosphorylierung aktiviert wird (Lee et al., 1995; Arisue et al., 2002; Schulz-Raffelt et al., 2007). Die Aktivierung der Expression von Hitzeschockproteinen liegt nach einer Kultivierung zwischen 20-25°C in einem Temperaturbereich zwischen 36-39°C. Ab einer Temperatur von 42°C sterben die Algenzellen ab (Tanaka et al., 2000; Kobayashi et al., 2014; Schroda et al., 2015).

1.8 Der Promotor *HSP70A* aus *C. reinhardtii*

Der bisher stärkste Promotor in *C. reinhardtii* ist eine Kombination aus dem Hitzeschockprotein 70 A Protein Promotor und dem Rubisco2 Protein Promotor. Auch Fusionen von *HSP70A* mit den beiden anderen Promotoren β_2 Tub und *HSP70B* führten zu guter Standardexpression unter nicht induzierten Bedingungen, da *HSP70A* als transkriptioneller Aktivator dient (Schroda et al., 2000). Die *HSP70A-RBCS2* Kombination ist hitzeinduzierbar. Man geht davon aus, dass *HSP70A* für das Offenhalten des Chromatins verantwortlich ist und außerdem aufgrund von Bindungen des HSF1 an die Hitzeschockelemente im Heat Shock Promotor die Chromatinstruktur des *RBCS2* an jene von *HSP70A* angepasst wird. Somit kann zum einen eine verstärkte Expression von downstream an *HSP70A* klonierten Promotoren festgestellt und weiterhin das Silencing reduziert werden (Schroda et al., 2002; Strenkert et al., 2013). Zusätzlich zu der möglichen Hitzeinduktion des *HSP70A* durch die enthaltenen HSEs, an welche HSF1 binden kann, sind noch weitere Möglichkeiten der Induktion des Promotors beschrieben.

Shao und Kollegen beschreiben die Induktion mittels reaktiven Sauerstoff Spezies wie Wasserstoffperoxid und Singulett- Sauerstoff (Shao et al., 2007). Die Induktion mit diesen beiden Elementen erfolgt dabei angesichts unterschiedlicher Mechanismen, welche jedoch unabhängig von der Bindung an Hitzeschockelemente sind (Shao et al., 2007). Außerdem kann der *HSP70A* auch durch Licht induziert werden (von Gromoff et al., 1989; Kropat et al., 1997; Kropat et al., 1998).

1.9 Reporterproteine in *C. reinhardtii*

Reporterproteine spielen eine wichtige Rolle in der Molekularbiologie. So können damit beispielsweise Interaktionen, Lokalisation und Bewegung eines ausgewählten Proteins nachgewiesen und beobachtet werden. Außerdem werden Reporterproteine dazu verwendet neuartige Promotorkombinationen auf ihre Expressionsstärke hin testen zu können. Um die Expression dieser Reporter im Kerngenom zu gewährleisten, werden diese zunächst auf die Codon Usage der Grünalge adaptiert. Verwendung finden hierbei vor allem lumineszierende und fluoreszierende Proteine, da sie gut und schnell nachweisbar sind. Die Messung des bei der Lumineszenz emittierten Lichts kann dabei in Plattenlesegeräten mittels Photomultipliern erfolgen. Die Fluoreszenz ist sowohl im Plattenlesegerät, als auch mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie detektierbar. Unter Lumineszenz versteht man allgemein die Produktion von Licht. Durch eine chemische Reaktion wird hierbei die notwendige Energie zur Verfügung gestellt. Die dafür verantwortlichen Enzyme werden als Luciferasen bezeichnet. Sie setzen Substrat, welches als Luciferin bekannt ist, um. Luciferasen kommen in unterschiedlichsten eukaryontischen und prokaryontischen Systemen vor. Sie stammen beispielsweise aus der Seefeder *Renilla reniformis* oder aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, welche als *Firefly* Luciferase bezeichnet wird. Die am häufigsten in *C. reinhardtii* verwendeten sind hierbei jene von *Gaussia princeps* und jene aus *Renilla reniformis* (Fuhrmann, 2004; Ruecker et al., 2008).

Fluoreszenz im Gegensatz dazu beschreibt den Vorgang bei dem durch Anregung- d.h. Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge, längerwelliges Licht emittiert wird. Dies geschieht durch die Absorption von Photonen und der damit verbundenen Anhebung von Elektronen in ein energetisch höheres Orbital. Kehren die Elektronen wieder in den Grundzustand zurück werden Licht und Wärme freigesetzt (Powell, 1947).

In Zusammenhang mit Fluoreszenz wird der sogenannte Stokes Shift als der Unterschied zwischen den Wellenlängen der Photonen des Anregungs- und Emissionslichts, welches immer längerwelliger ist, bezeichnet (Stokes, 1852). Fluoreszenzproteine sind prinzipiell in einer breiten Farbpalette verfügbar, die bekanntesten hierbei sind das grün fluoreszierende Protein - GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* und die als YFP bezeichneten Derivate sowie das rot fluoreszierendes Protein - RFP aus *Discosoma sp.* (Shimomura et al., 1962). Diese werden ständig weiterentwickelt, um z.B. Helligkeit und pH-Stabilität erhöhen zu können. Die bisher am weitest verbreiteten Reporter in *C. reinhardtii* sind in nachfolgender Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Reportergene im Kerngenom von *C. reinhardtii* (Kirchmayr und Griesbeck, 2012; Mussnug, 2015)

Reporter	Beschreibung	Referenz
ARS	Arylsulfatase	(Davies et al., 1992)
<i>crgfp</i>	Codon-optimiertes GFP-Kernexpression	(Fuhrmann et al., 1999)
<i>crluc</i>	Kern-codon-optimierte Luciferase von <i>Renilla reniformis</i>	(Fuhrmann et al., 2004)
<i>cgluc</i>	Kern codon-optimierte <i>Gaussia princeps</i> Luciferase	(Ruecker et al., 2008)
YFP	Fluoreszenzprotein	(Neupert et al., 2009)
xyn1	Xylanase 1	(Rasala et al., 2012)
CFP	Fluoreszenzprotein	(Lim et al., 2013)
mTagBFP	Fluoreszenzprotein	(Rasala et al., 2013)
mCerulean	Fluoreszenzprotein	(Rasala et al., 2013; Lauersen et al., 2015)
Venus	Fluoreszenzprotein	(Rasala et al., 2013; Lauersen et al., 2015)
tdTomato	Fluoreszenzprotein	(Rasala et al., 2013)
mCherry	Fluoreszenzprotein	(Rasala et al., 2013)
Gus	β -Glucuronidase	(Pratheesh et al., 2014)
Clover	Fluoreszenzprotein	(Lauersen et al., 2015)
mRuby2	Fluoreszenzprotein	(Lauersen et al., 2015)
ARS2	Arylsulfatase Farbbassay	(Specht et al., 2015)

Die Reporter, welche für den Nachweis der Expression im Chloroplasten verwendet werden sind in einem kürzlich erschienenen Review von Mussnug zusammengefasst (Mussnug, 2015).

1.9.1 *Renilla reniformis* Luciferase-crluc

Die in dieser Arbeit verwendete und an die Codon Usage des Kerngenoms der Alge angepasste eukaryontische Luciferase wird aus der Seefeder *Renilla reniformis* gewonnen und wurde von Fuhrmann (Fuhrmann et al., 2004) in *Chlamydomonas reinhardtii* etabliert. Sie besitzt eine Größe von 35 kDa und kommt als einzelne Polypeptidkette vor. Die ideale Temperatur beträgt 32°C bei einem pH Wert von 7,4. Wie in Abbildung 3 gezeigt ist, wird mithilfe des Substrats Coelenterazin und Sauerstoff Coelenteramid, Kohlendioxid und blaues Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm erzeugt (Matthews et al., 1977). Dieses kann mithilfe eines Plattenlesegeräts gemessen werden und gibt Aufschluss über die Enzymmenge und somit die Promotorstärke.

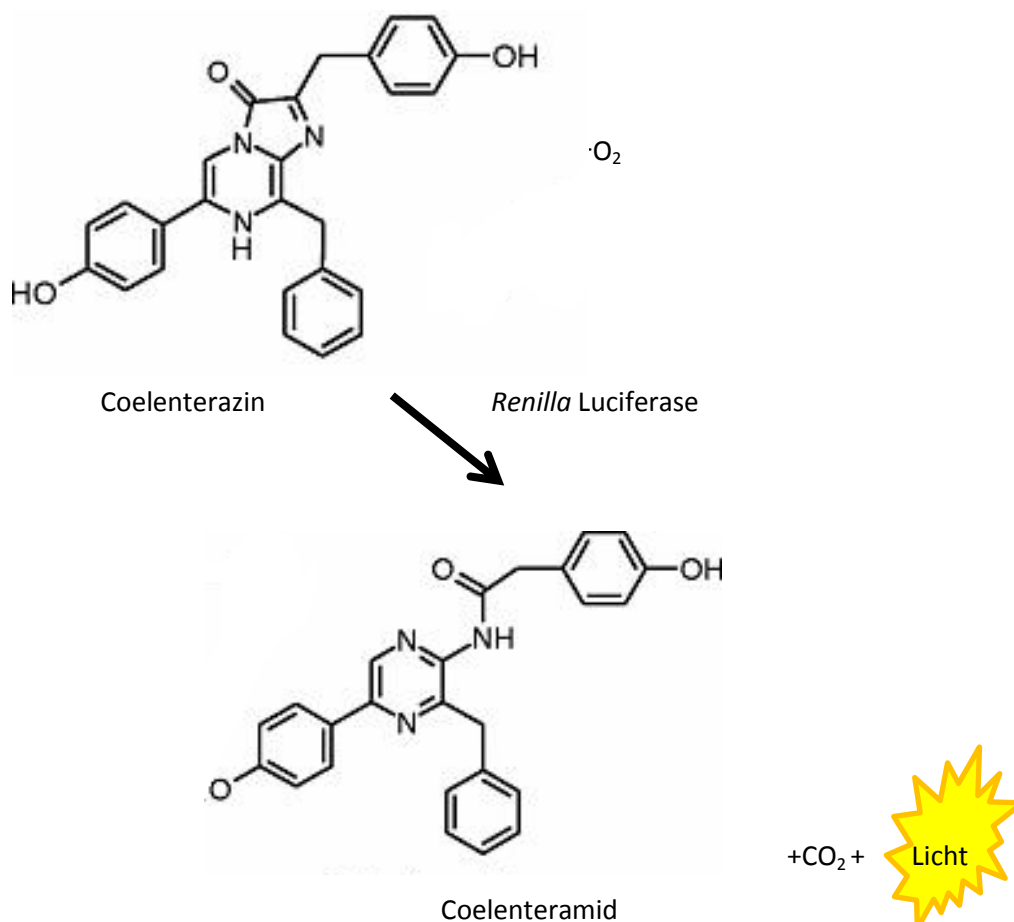


Abbildung 3: Reaktion *Renilla reniformis* Luciferase (Matthews et al., 1977)

1.9.2 GFP

GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* wurde bereits 1962 von Shimomuro entdeckt und aufgereinigt. Es findet seither breite Anwendung in der Molekularbiologie (Shimomura et al., 1962). Auch dieses Protein wurde bereits an die Codon Usage von *C. reinhardtii* angepasst. Allerdings tritt hierbei, wie in Diagramm 1 gezeigt, das Problem auf, dass sich die Anregungswellenlängen stark mit jenen von Chlorophyll überschneiden (Fuhrmann et al., 1999).

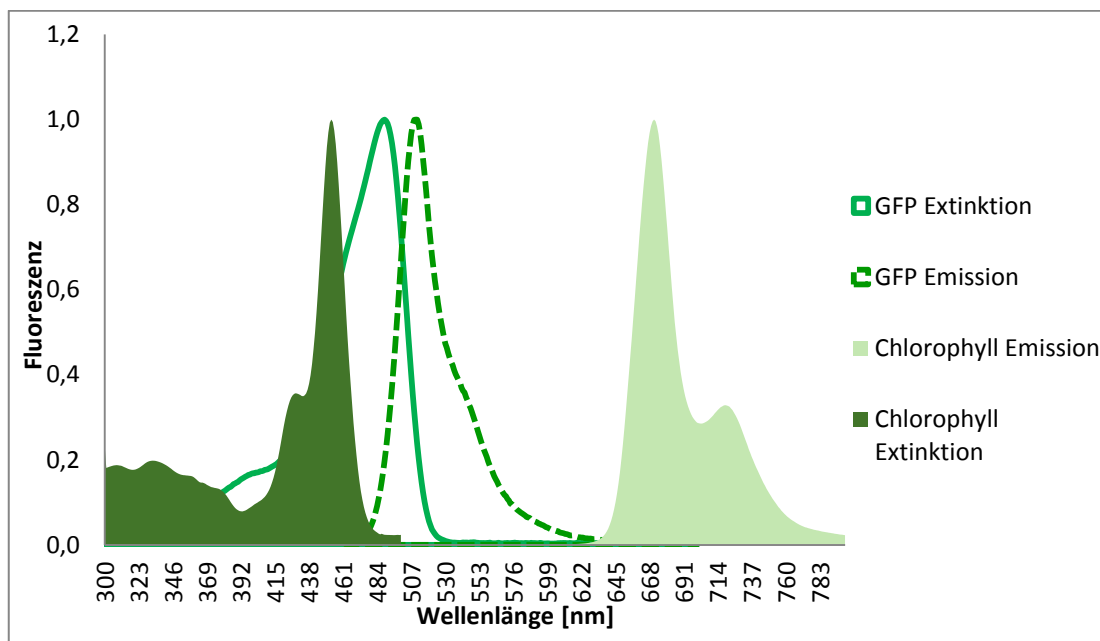


Diagramm 1: Spektren GFP und Chlorophyll (Shimomura et al., 1962)

1.9.3 tagRFP

TagRFP bezeichnet ein als Proteintag einsetzbares, monomeres Fluoreszenzprotein. Das Ursursprungprotein ist ein rot fluoreszierendes GFP-ähnliches Protein, welches als eqFP578 bezeichnet wurde und aus der Anemone *Entacmaea quadricolor* stammt. Dieses Protein wurde durch Zufallsmutagenese zu turboRFP weiterentwickelt und anschließend durch site-directed Mutagenese zu tagRFP. Diese Ansätze dienen zum einen der Verbesserung der pH-Stabilität und der Geschwindigkeit. Zum anderen wurde aus einem Trimer ein Monomer entwickelt. TagRFP weist somit eine starke Fluoreszenz im hellroten Bereich auf und hat ein Anregungsmaximum bei 555 nm und ein Emissionsmaximum bei 584 nm.

Aufgrund der um das dreifach höheren Helligkeit als das häufig verwendete mCherry und der hohen pH- Stabilität findet dieses Protein in vielfältigen Fragestellungen Anwendung (Merzlyak et al., 2007). Das Fluoreszenzspektrum von tagRFP ist in Diagramm 2 gezeigt.

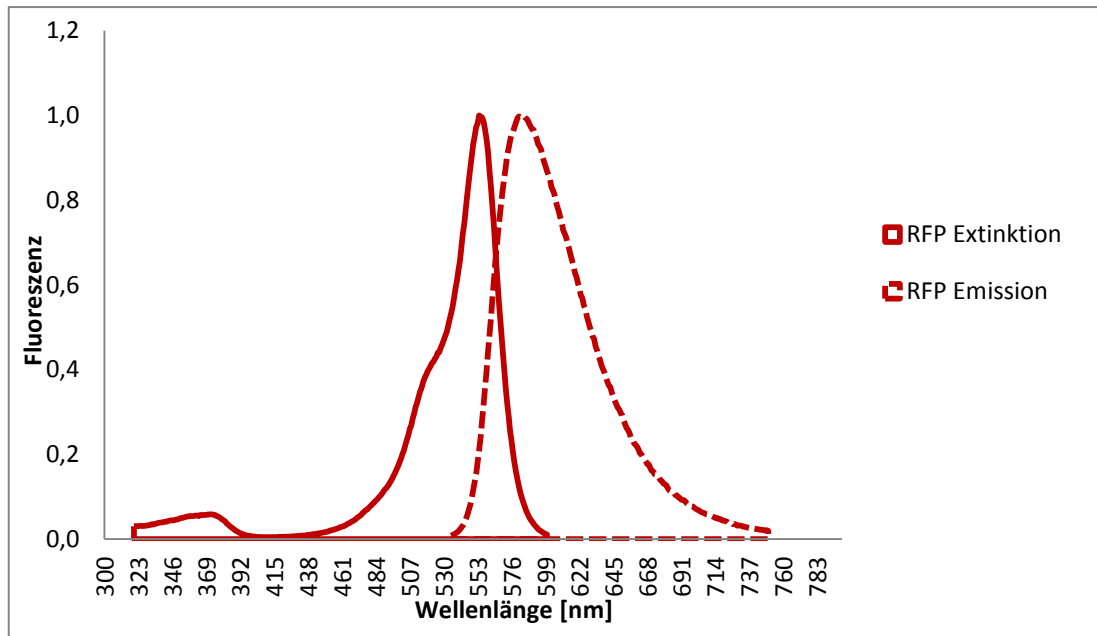


Diagramm 2: tagRFP Fluoreszenzspektrum (Merzlyak et al., 2007)

1.9.4 mCherry

mCherry hat ein Extinktionsmaximum bei 587 nm und ein Emissionsmaximum bei 610 nm. Das monomere Fluoreszenzprotein wurde ursprünglich aus dem Organismus *Discosoma sp.* isoliert und ist eine Weiterentwicklung des Proteins Ds Red. Es weist eine hohe pH-Stabilität auf (Shaner et al., 2004). Das Fluoreszenzspektrum von mCherry ist in Diagramm 3 gezeigt

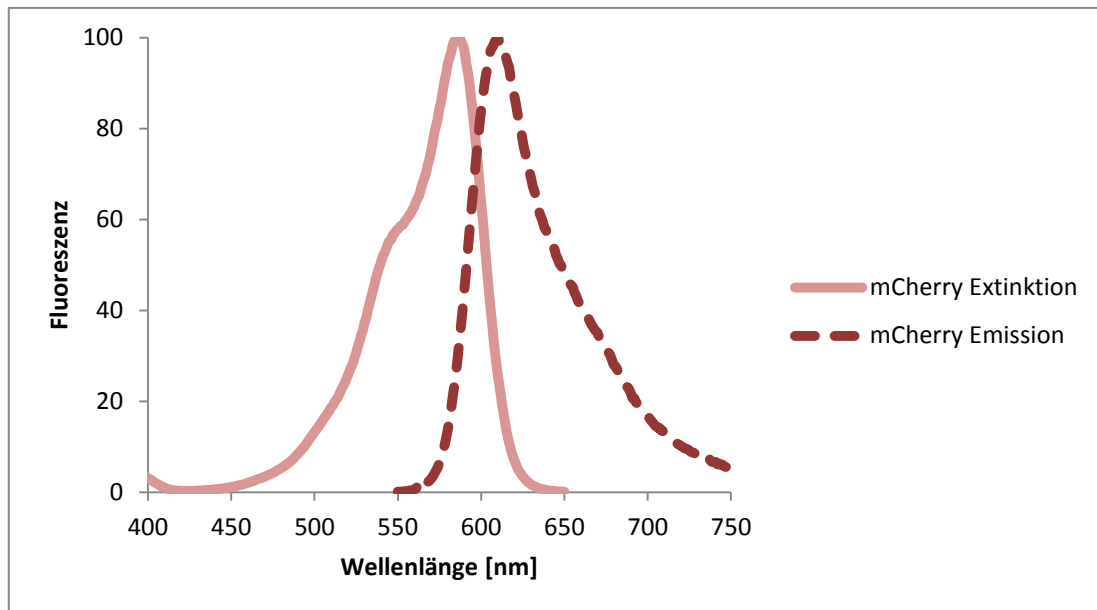


Diagramm 3: Spektren mCherry nach (Shaner et al., 2004)

1.9.5 Vergleich tagRFP-mCherry

In folgender Tabelle werden die zwei rot fluoreszierenden Proteine tagRFP und mCherry miteinander verglichen. Als Referenz für die Helligkeit wird hierbei enhanced GFP (eGFP) verwendet, welches optimierte Sequenzen und somit größere Helligkeit aufweist als das natürliche GFP.

Tabelle 5: Vergleich der Fluoreszenzproteine (Merzlyak et al., 2007)

Fluoreszenzprotein	Ex [nm]	Em [nm]	Struktur	Helligkeit (% von eGFP)
tagRFP	555	584	Monomer	142
mCherry	587	610	Monomer	47

TagRFP ist ,wie aus oben stehendem Vergleich ersichtlich wird, um das ca. dreifache heller als mCherry (Shaner et al., 2004; Merzlyak et al., 2007; Shaner et al., 2008).

1.9.6 Weitere Fluoreszenzproteine in *C. reinhardtii*

Rasala und Kollegen beschrieben außerdem 2013 die Anwendbarkeit von sechs weiteren Fluoreszenzproteinen: blau mTagBFP, cyan mCerulean, grün CrGFP, gelb Venus, orange tdTomato und rot mCherry in *Chlamydomonas reinhardtii* (Rasala et al., 2013). Lauenstein und Kollegen zeigten 2015 die Verwendung von mCerulean3, mVenus, mRuby2 und Clover. Tabelle 6 zeigt die Eigenschaften dieser Fluoreszenzproteine.

Tabelle 6: Weitere Fluoreszenzproteine in *C. reinhardtii* (Nagai et al., 2002; Rizzo et al., 2004; Shaner et al., 2004; Kremers et al., 2006; Markwardt et al., 2011; Lam et al., 2012; Rasala et al., 2013; Lauenstein et al., 2015)

Fluoreszenzprotein	Ex [nm]	Em [nm]	Struktur	Helligkeit (% von eGFP)
mTagBFP	402	457	Monomer	98
mCerulean	433	475	Monomer	79
CrGFP	484	507	Monomer	100
Venus	515	528	Monomer	156
tdTomato	554	581	Dimer	283
mCherry	587	610	Monomer	47
mCerulean3	433	475	Monomer	109
mVenus	515	527	Monomer	156
mRuby2	559	600	Monomer	127
Clover	505	515	Monomer	250

2 Ziel der Arbeit

Die eukaryontische Grünalge *C. reinhardtii* ist aufgrund ihres GRAS-Status und der kostengünstigen und schnellen Kultivierung möglicherweise als Expressionssystem für biotechnologisch relevante, rekombinante Proteine geeignet. Bisher ist es allerdings ausschließlich im Chloroplasten der Alge möglich, eine für die vorliegenden Anwendungsgebiete relevante Menge an Fremdprotein zu produzieren. Das Kerngenom als Expressionsort ist jedoch hinsichtlich der Möglichkeit das Protein ins Medium sezernieren zu können für einige biotechnologische Produkte zu bevorzugen. Außerdem ist diese Alge als eukaryontisches System in der Lage posttranslationale Modifikationen durchzuführen. Da die Glykosylierungsmuster allerdings noch nicht vollständig untersucht sind, kann bisher nicht vorausgesagt werden, ob die daraus entstehenden modifizierten Proteine für die Anwendung in der Humanmedizin verwendet werden können. Speziell bei der Methode der Transgenexpression im Kerngenom gilt es noch einige Hürden zu überwinden, um die Ausbeuten an Fremdprotein noch deutlich zu erhöhen. Im Gegensatz zum Chloroplastengenom werden Transgene im Kern durch nicht gerichtete Rekombination ins Genom eingebaut. Außerdem tritt nach gewisser Zeit bei nahezu allen Transgenen eine signifikante Abnahme der Proteinmenge auf. Dies ist aufgrund vorliegender *Silencing* Mechanismen, welche noch nicht vollständig geklärt werden konnten, der Fall. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expressionsrate im Kern zu erhöhen. Um dies zu ermöglichen wurden Promotorstudien durchgeführt. Bei den bisher verwendeten Expressionssystemen werden zumeist Viruspromotoren eingesetzt, um eine starke Expression zu erreichen (Tabor et al., 1985; Battraw et al., 1990; Griffiths et al., 1997; Wurm et al., 1999; Ruecker et al., 2008). Da es allerdings bisher keine bekannten Viren gibt, welche *C. reinhardtii* befallen, sollten im ersten Schritt Promotoren des Virus einer anderen Grünalge nämlich jener des *Chlorella* Virus *PBCVI* auf ihre Expressionsstärke hin getestet werden. Dieses Virus wurde ausgewählt, da mit dessen Promotoren bereits erhöhte Expression von Transgenen in Pflanzen, Bakterien und zwei *Chlorella* Arten erreicht werden konnte (Mitra et al., 1994a; Mitra et al., 1994b; Kang et al., 2000; Mitra et al., 2001; Xia, 2001, Xia, 2002). Außerdem sollte der starke endogene Promotor des Rubisco2 Proteins mit synthetischen Hitzeschockelementen kombiniert werden. Dies sollte eine starke induzierbare Expression des Transgens bewirken und somit eine Steigerung der Produktausbeute ermöglichen.

Weiterhin war es das Ziel den neuen fluoreszierenden Reporter tagRFP in *C. reinhardtii* zu etablieren. Dieser sollte zum einen mit anderen Reportersystemen verglichen werden und die Detektion erleichtern. Mittels FACS, Fluoreszenzmikroskop und Plattenlesegerät sollte die Anwendbarkeit getestet werden. Die möglicherweise gesteigerte Expression von Transgenen unter optimierten Untersuchungsmethoden durch die neue Reporteranalyse stellt einen wichtigen Schritt für die Einsetzbarkeit von *C. reinhardtii* als Expressionssystem für Nischenprodukte dar.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Enzym-Messung mit aufgereinigter *Renilla Luciferase*

Bevor die Messung der Algenklone mit unterschiedlichen Promotoren gestartet wurde, wurde eine Luciferase Standardgerade erstellt. Diese sollte der späteren Abschätzung der Konzentration des Enzyms in den Algen und vorrangig auch der Etablierung der Messung dienen. Dazu wurde rekombinante *Renilla reniformis* Luciferase in unterschiedlichen Puffersystemen mit verschiedenen Substratkonzentrationen getestet. Zum einen fanden die beiden Standardpuffer, der Assay- und Enzympuffer Anwendung. Anschließend wurde Tris-Acetat-Phosphat-Medium (TAP) verwendet, um feststellen zu können wie sich die Luciferase exprimierenden Klone verhalten. Dabei wurde die Luciferasekonzentration zwischen 50 µg und 50 pg vorgelegt. Mithilfe dieser Messung wurde 10 µM Coelenterazin bei Messungen mit TAP als Standard festgelegt. In den Diagrammen 4 und 5 sind die Standardgeraden mit den unterschiedlichen Puffersystemen und verschiedenen Substratkonzentrationen gezeigt.

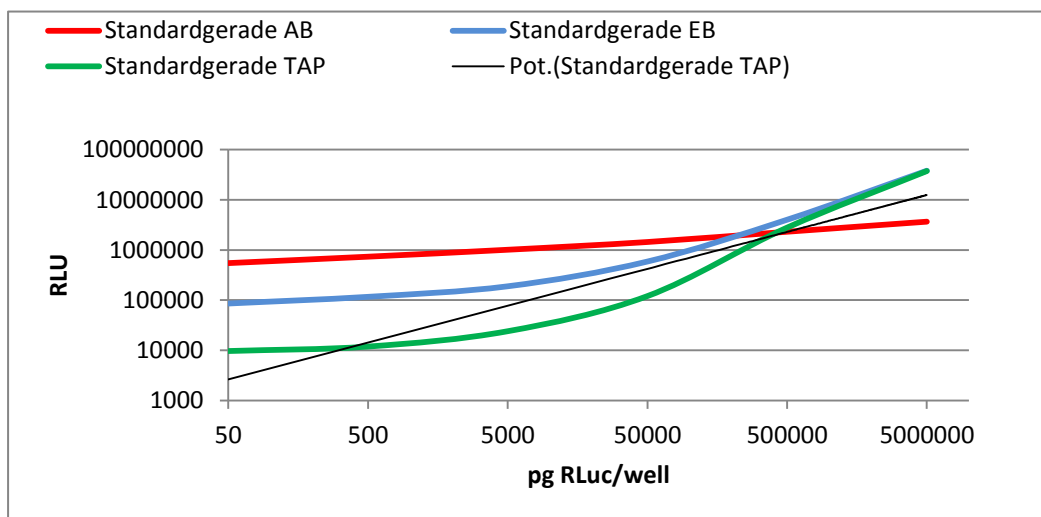


Diagramm 4: Standardgerade Renilla Luciferase in TAP, EB, AB mit 5µM CTZ

In Diagramm 4 ist die Standardgerade der Messung mit aufgereinigter Luciferase in unterschiedlichen Puffersystemen (Assaypuffer (AB), Enzympuffer (EB) und TAP-Medium (TAP)) und mit einer Konzentration von 5 µM Substrat Coelenterazin dargestellt. Wie daraus ersichtlich ist, musste die Messung noch weiter optimiert werden.

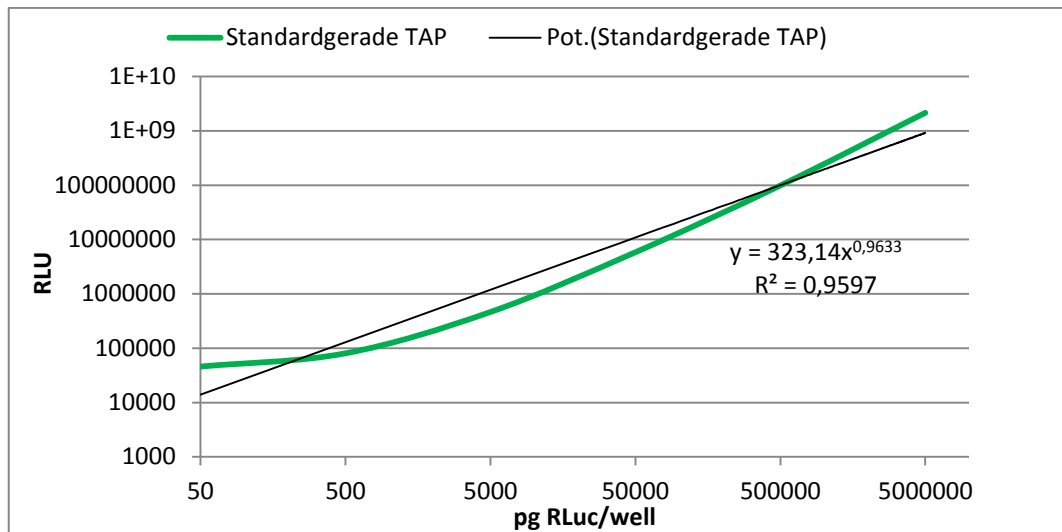


Diagramm 5: Standardgerade Renilla Luciferase in TAP mit 10 µM CTZ

Im Diagramm 5 ist die Standardgerade mit aufgereinigter Renilla Luciferase in TAP-Medium und mit der Coelenterazin-Substratkonzentration von **10 µM** dargestellt. Diese Messung wurde als Standard für die folgenden Algenklonmessungen verwendet.

3.2 Die Promotoren des Chlorella Virus PBCVI

Da es bisher keine bekannten Viren gibt, welche *C. reinhardtii* befallen, wurden sechs verschiedene, starke *early* Virus Promotoren aus dem *Chlorella vulgaris* Virus PBCVI ausgewählt. Promotoren dieses Virus bewirkten erhöhte Expression in Bakterien, höheren Pflanzen und zwei *Chlorella* Arten und sollten somit auf ihre Anwendbarkeit für die erhöhte Transgenexpression in *C. reinhardtii* getestet werden (Mitra et al., 1994a; Mitra et al., 1994b; Mitra et al., 2001; Xia, 2001, Xia, 2002; Kang et al., 2000). Die verwendeten Promotoren dieses Virus sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 7: Promotoren des Chlorella Virus PBCVI

Plasmidderivat Name	Ursprungsplasmid	Chlorella Virus Promotor
pMCI7	pXX186	DNA Topoisomerase II Gen
pMCI8	pXX186	Coat Like Protein Gen
pMCI10	pXX186	K ⁺ - Ionenkanalprotein Gen
pMCI11	pXX186	DNA Polymerase Gen
pMCI12	pXX186	Chitinase Gen

Die entsprechenden DNA-Abschnitte der Promotoren wurden mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pXX186 ligiert (Jacob, 2007).

Nach der Sequenzierung erfolgte mittels Cre loxP System die Fusion mit pXX208 (Heitzer et al., 2007b). Die Fusionsplasmide (pMCI13 und 14, pMCI 16-18) konnten nach der Transformation in den arginindefizienten *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm 302cw15arg7 mittels Glasperlen-Methode auf ihre *Renilla* Luciferase Aktivität analysiert werden (Kindle, 1990). In Abbildung 4 ist anhand des Plasmids pMCI8 das Ergebnis der Klonierung der Viruspromotoren in pXX186 beschrieben.

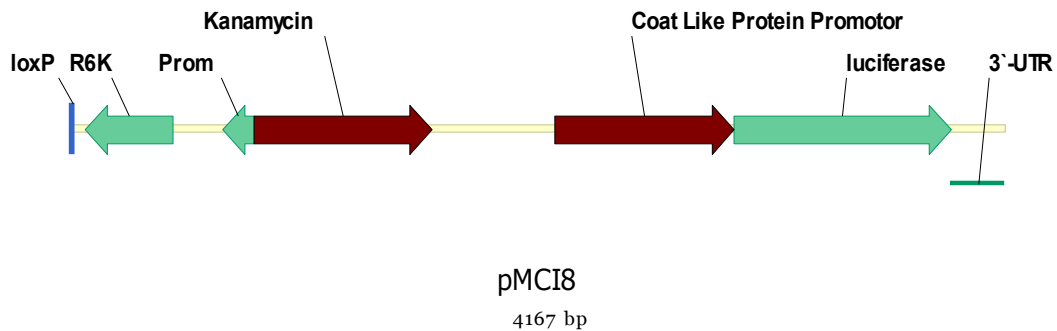


Abbildung 4: Plasmid mit PBCVI Viruspromotor

Es ist das Plasmid pMCI8 gezeigt, welches durch Ligation des Coat Like Protein Promotor des PBCVI Virus mit dem Plasmid pXX186 generiert wurde. Das Plasmid enthält die loxP Erkennungssequenz für die Fusion mittels Cre Rekombinase (loxP), den R6ky Replication Ori (R6K) für die Klonierung in *E. coli*, ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotika Kanamycin (Kanamycin), den Coat Like Protein Promotor aus PBCVI und *Renilla* Luciferase (Luciferase) als Reporter in *C. reinhardtii*

Abbildung 5 zeigt die Fusion aus pMCI8 mit pXX208.

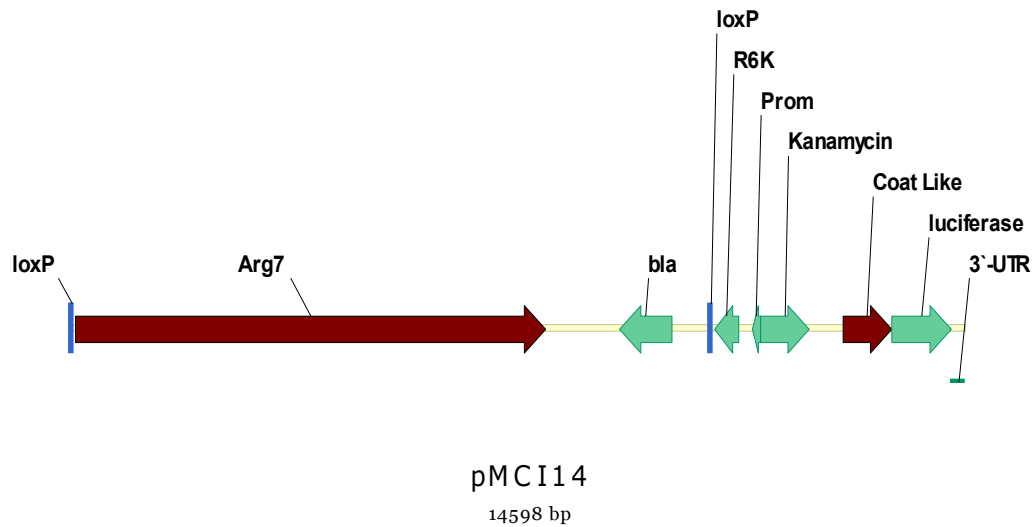


Abbildung 5: Fusionsplasmid mit PBCVI Viruspromotor und Arg7

Es ist die Fusion mittels Cre Rekombinase von pMCI8 mit pXX208 dargestellt. Das Plasmid enthält die loxP Erkennungssequenz für die Fusion mittels Cre Rekombinase (loxP), den R6ky Replication Ori (R6K) für die Klonierung in E. coli, ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotika Kanamycin (Kanamycin), den Coat Like Protein Promotor aus PBCVI, Renilla Luciferase (Luciferase) als Reporter in C. reinhardtii, die Resistenz gegen Ampicillin (bla) und das Arginigen für die Kompensation des Defekts im verwendeten Mutantenstamm als Selektionsmarker in C. reinhardtii.

Bei der Plattenlesermessung konnte, wie das untenstehende Diagramm 6 zeigt, keine Expression des Reportergens gemessen werden, weshalb die vorliegenden Viruspromotoren nicht für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

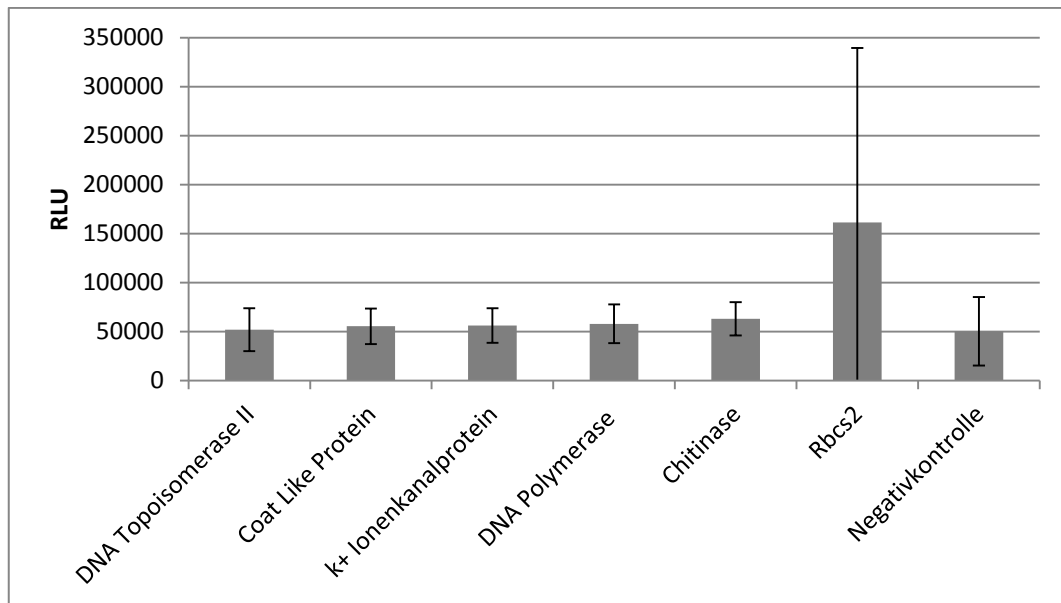


Diagramm 6: Plattenlesermessungen Chlorellaviruspromotoren

Diagramm 6 zeigt das Ergebnis der Luciferasemessung der unterschiedlichen Plasmide mit den PBCVI Virus Promotoren am Plattenlesegerät. Dargestellt ist hierbei der Mittelwert aus 96 Klonen pro Promotorkonstrukt inklusive Standardabweichung. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pXX208 verwendet, welches nur das ARG7 Gen für die Selektion der Algenklone enthält und keinen Promotor und keine Renilla Luciferase. Der RBCS2 Promotor diente als Positivkontrolle. Wie aus den Werten für die relative Lichtstärke ersichtlich wird, konnte keine Expression der Luciferase unter der Kontrolle der Viruspromotoren festgestellt werden.

3.3 Luciferase Expressionsmessungen mit den synthetischen Promotorkonstrukten HSE1x-6x-RBCS2 und HSE8x-RBCS2

Es sollte die Anwendbarkeit von synthetischen Hitzeschockelementen in *C. reinhardtii* getestet werden. Dazu wurden unterschiedliche Kombinationen der HSEs kloniert und anschließend erfolgte die Bewertung des Promotors mittels Luciferase Expressionsmessungen.

3.3.1 Klonierung HSE1x bis HSE6x-RBCS2, HSE8x-RBCS2

Um die mögliche Anwendung von synthetischen hitzeinduzierbaren Promotorelementen testen zu können, wurden die in folgender Tabelle dargestellten Kombinationen kloniert. (Czerny et al., 2005). Die Klonierung der HSE1x bis HSE6x-RBCS2 und HSE8x-RBCS2 Konstrukte erfolgte mittels PCR Amplifizierung bzw. synthetisierten HSEs und anschließender Ligation in das Plasmid pXX186 (Heitzer et al., 2007b). Anschließend wurde mithilfe des Cre loxP Systems, die Fusionierung der entstandenen Plasmide mit pXX208 durchgeführt. Die Plasmide sind in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle 8: Plasmide HSE1x-6x-RBCS2 und HSE8x-RBCS2

Plasmidname	Fusion	Beschreibung
pMCI100	pMCI94+pXX208	HSE1x-RBCS2 Luciferase+Arg
pMCI101	pMCI95 +pXX208	HSE2x-RBCS2 Luciferase+Arg
pMCI102	pMCI96+pXX208	HSE3x-RBCS2 Luciferase+Arg
pMCI103	pMCI97+pXX208	HSE4x-RBCS2 Luciferase+Arg
pMCI104	pMCI98+pXX208	HSE5x-RBCS2 Luciferase+Arg
pMCI105	pMCI99+pXX208	HSE6x-RBCS2 Luciferase+Arg
pMCI54	pMCI51+pXX208	HSE8x-RBCS2 Luciferase+Arg

In der folgenden Abbildung 6 ist das Plasmid mit dem Promotor HSE8x-RBCS2 schematisch dargestellt.

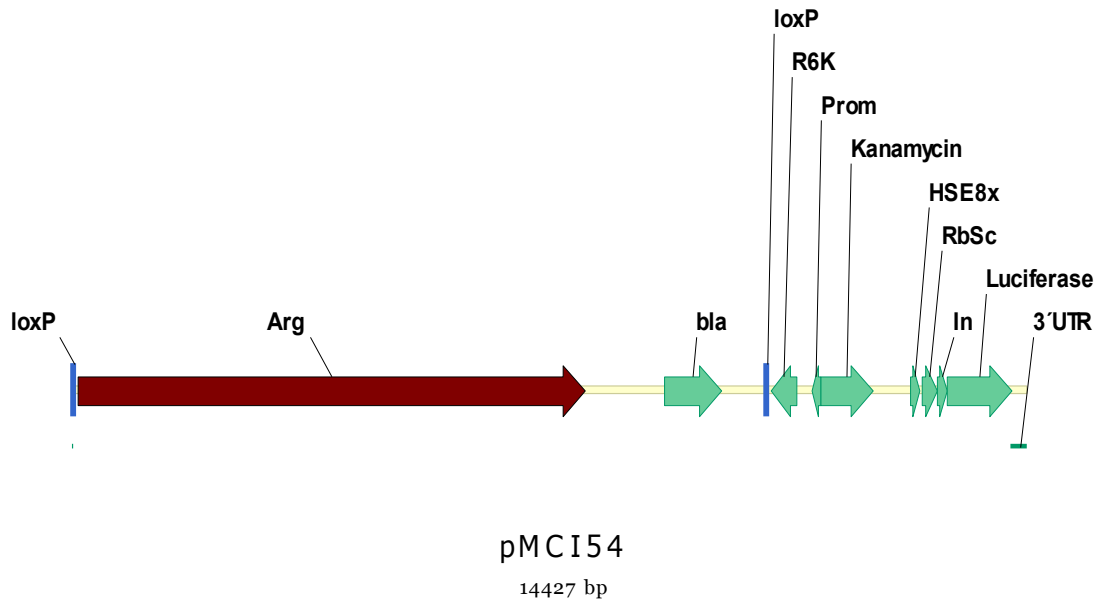


Abbildung 6: Fusionsplasmid mit HSE8x-RBCS2 Promotor und Arg7

*Es ist das Plasmid pMCI54 gezeigt, welches durch Ligation HSE8x_RBCS2 Promotors mit dem Plasmid pXX186 und anschließender Cre-loxP Fusion mit pXX208, generiert wurde. Das Plasmid enthält die loxP Erkennungssequenz für die Fusion mittels Cre Rekombinase (loxP), den R6ky Replication Ori (R6K) für die Klonierung in *E. coli*, ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotika Kanamycin (Kanamycin) und eines gegen Ampicillin (*bla*) den HSE8x-RBCS2 Promotor, Renilla Luciferase (Luciferase) als Reporter und Arginin als Selektionsmarker (Arg) in *C. reinhardtii**

3.3.2 Messung der Luciferase-Standardexpression mit den Promotorkombinationen HSE1x-6x-RBCS2

Die Messung der Luc Expression mit den Promotoren HSE1x bis 6x und HSE8x in Kombination mit RBCS2 erfolgte im Plattenlesegerät wie im Methodenteil beschrieben. Es wurde 5 s in TAP-Medium unter Zugabe von 10 µM Coelenterazin gemessen. Dabei wurden drei voneinander unabhängige Transformationen (Messung 1-3) mit jeweils maximal 48 Klonen pro Promotorkonstrukt gemessen. Gezeigt sind hierbei nur die Mittelwerte jener Klone, welche Werte über 5000 relativen Lichteinheiten aufwiesen, da die Negativkontrollen pMCI26 (Plasmid mit Luc ohne Promotor) und der Wildtyp in diesem Bereich lagen und somit alles darunter als negativ anzusehen war.

*HSP70A*lang-RBCS2 beschreibt hierbei den häufig verwendeten verlängerten *HSP70A* inklusive HSE4 (Schroda et al., 2002). In den jeweiligen Tabellen sind die Messwerte sowie die Klonanzahlen angegeben.

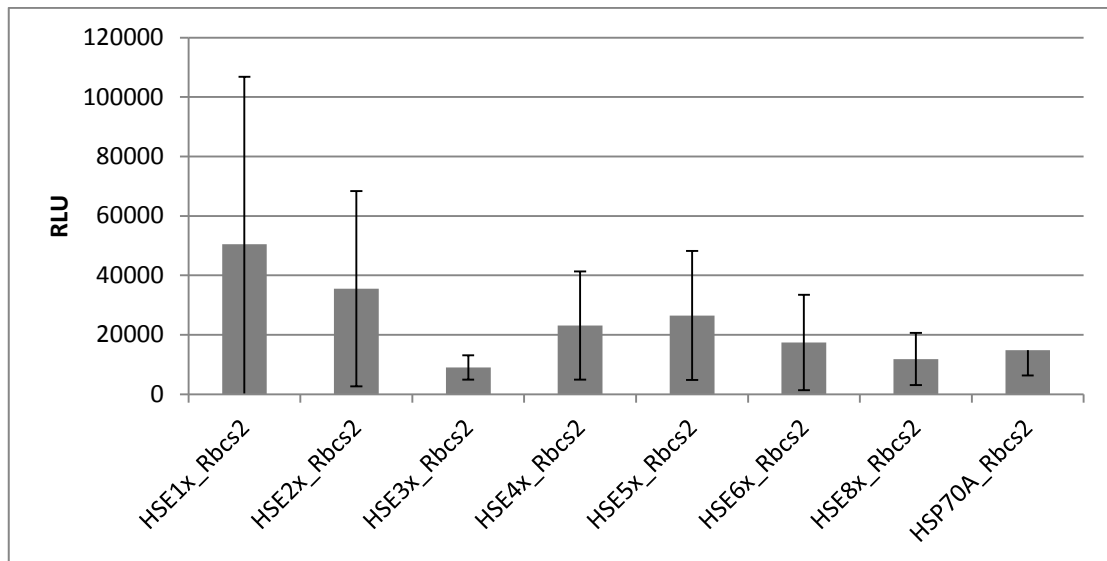


Diagramm 7: Messung 1 der Standardexpression HSE1x bis HSE6x-RBCS2

In Diagramm 7 ist die erste Messung von 48 Klonen und davon jeweils der Mittelwert inklusive Standardabweichung dargestellt. Dabei diente HSP70A-RBCS2 als Positivkontrolle, als Negativkontrolle wurden der Wildtypstamm und Klone, welche pMCI26 (Luciferase ohne Promotor) enthielten, verwendet. Dargestellt sind alle Werte über 5000 RLU, da in diesem Bereich die Negativen zu finden waren. HSE1x-RBCS2 weist dabei die höchste Standardexpression auf.

Folgenden Tabellen zeigen eine Zusammenfassung der Messwerte und die Anzahl der gemessenen und positiven Klone.

Tabelle 9: Werte der Messung 1 Standardexpression HSE1x bis HSE6x-RBCS2

Promotor	RLU-Mittelwerte (ohne negative)	Standardabweichung
HSE1x-RBCS2	50426,8	56377,9
HSE2x-RBCS2	35527,8	32863,7
HSE3x-RBCS2	9019,6	4088,4
HSE4x-RBCS2	23111,3	18164,5
HSE5x-RBCS2	26466,8	21702,9
HSE6x-RBCS2	17418,1	16047,5
HSE8x-RBCS2	11830,7	8759,7
HSP70A-RBCS2	14827,9	7809,7

Tabelle 10: Klon Messung 1 Standardexpression

Promotor	Klonanzahl gesamt	Klonanzahl positiv	% positive Klone
HSE1x-RBCS2	40	32	80
HSE2x-RBCS2	48	48	100
HSE3x-RBCS2	18	14	77,8
HSE4x-RBCS2	48	48	100
HSE5x-RBCS2	46	44	95,7
HSE6x-RBCS2	22	14	63,6
HSE8x-RBCS2	48	38	79,1
HSP70A-RBCS2	48	19	39,6

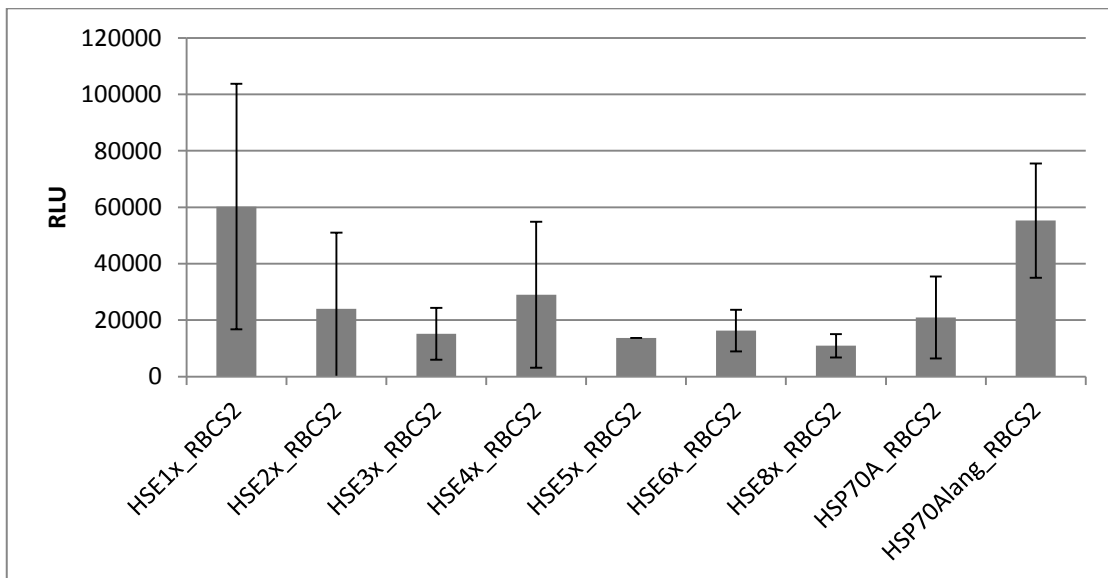


Diagramm 8: Messung 2 Standardexpression HSE1x bis HSE6x-RBCS2

Diagramm 8 zeigt die zweite Messung von 48 Klonen. Aufgetragen ist hierbei jeweils der Mittelwert inklusive Standardabweichung. Dabei diente HSP70A-RBCS2 als Positivkontrolle, als Negativkontrolle wurden der Wildtypstamm und Klone, welche pMCI26 (Luciferase ohne Promotor) enthielten, verwendet. Dargestellt sind alle Werte über 5000 RLU, da in diesem Bereich die negativen zu finden waren. HSE1x-RBCS2 weist dabei die höchste Standardexpression auf.

Folgende Tabellen zeigen eine Zusammenfassung der Messwerte und die Anzahl der gemessenen und jene der positiven Klone.

Tabelle 11: Werte der Messung 2 Standardexpression HSE1x bis HSE6x-RBCS2-

Promotor	RLU-Mittelwerte (ohne negative)	Standardabweichung
HSE1x-RBCS2	60042,8	43449,1
HSE2x-RBCS2	21530,6	12873,6
HSE3x-RBCS2	15119,3	9177,9
HSE4x-RBCS2	29007,1	25810,5
HSE5x-RBCS2	13699,0	0,0
HSE6x-RBCS2	16308,5	7413,3
HSE8x-RBCS2	12630,6	2873,6
HSP70A-RBCS2	20936,7	14478,2
HSP70Alang-RBCS2	55275,8	20265,8

Tabelle 12: Klone Messung 2 Standardexpression

Promotor	Klonanzahl gesamt	Klonanzahl positiv	% positive Klone
HSE1x-RBCS2	48	32	66,7
HSE2x-RBCS2	48	20	41,7
HSE3x-RBCS2	48	43	89,6
HSE4x-RBCS2	48	9	18,8
HSE5x-RBCS2	23	1	4,3
HSE6x-RBCS2	24	10	41,7
HSE8x-RBCS2	48	20	41,7
HSP70A-RBCS2	48	14	29,2
HSP70Alang-RBCS2	30	12	40,0

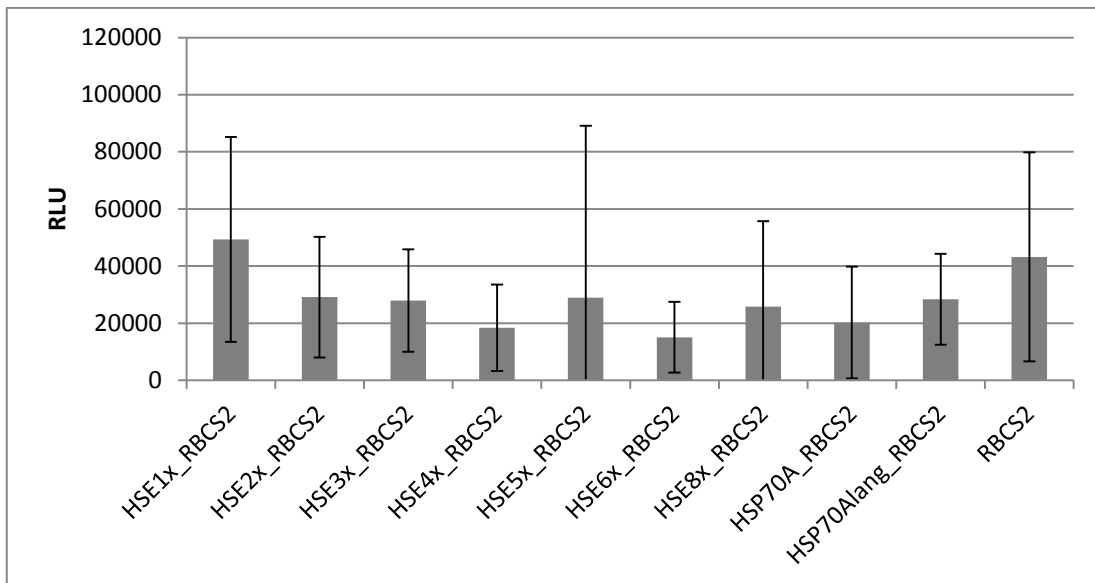


Diagramm 9: Messung 3 Standardexpression HSE1x bis 6x-RBCS2

Diagramm 9 zeigt die dritte Messung von 48 Klonen. Davon ist jeweils der Mittelwert inklusive Standardabweichung dargestellt. Dabei diente HSP70A-RBCS2 als Positivkontrolle, Als Negativkontrolle wurden der Wildtypstamm und Klone, welche pMCI26 (Luciferase ohne Promotor) enthielten, verwendet. Dargestellt sind alle Werte über 5000 RLU, da in diesem Bereich die negativen zu finden waren. HSE1x-RBCS2 weist dabei die höchste Standardexpression auf.

Folgenden Tabellen zeigen eine Zusammenfassung der Messwerte und die Anzahl der gemessenen und jene der positiven Klone.

Tabelle 13: Werte der Messung 3 Standardexpression HSE1x bis HSE6x-RBCS2

Promotor	RLU-Mittelwerte (ohne negative)	Standardabweichung
HSE1x-RBCS2	49322,5	35866,9
HSE2x-RBCS2	29118,7	21145,5
HSE3x-RBCS2	27928,8	17968,8
HSE4x-RBCS2	18416,2	15169,6
HSE5x-RBCS2	28907,4	60269,7
HSE6x-RBCS2	15082,8	12415,5
HSE8x-RBCS2	25790,7	29968,8
HSP70A-RBCS2	20256,6	19508,8
HSP70Alang-RBCS2	28436,6	15915,9
RBCS2	43188,0	36584,9

Tabelle 14: Klon Messung 3 Standardexpression

Promotor	Klonanzahl gesamt	Klonanzahl positiv	% positive Klone
HSE1x-RBCS2	48	44	91,7
HSE2x-RBCS2	48	34	70,8
HSE3x-RBCS2	48	37	77,1
HSE4x-RBCS2	48	14	29,2
HSE5x-RBCS2	48	26	54,2
HSE6x-RBCS2	48	33	68,8
HSE8x-RBCS2	48	29	60,4
HSP70A-RBCS2	48	30	62,5
HSP70A _{lang} -RBCS2	48	34	70,8
RBCS2	17	9	52,9

Wie aus den drei voneinander unabhängigen Messungen ersichtlich wird, ist der Mittelwert der Grundexpression an Luc bei der Promotorkombination HSE1x-RBCS2 reproduzierbar am höchsten.

3.3.3 Standardexpression HSE1x bis HSE6x-RBCS2 der drei Klone mit höchster Luciferase-Expression

Die folgenden Diagramme zeigen die Expression an Luciferase der drei Klone mit der höchsten gemessenen Lumineszenz der soeben gezeigten drei unabhängigen Messungen.

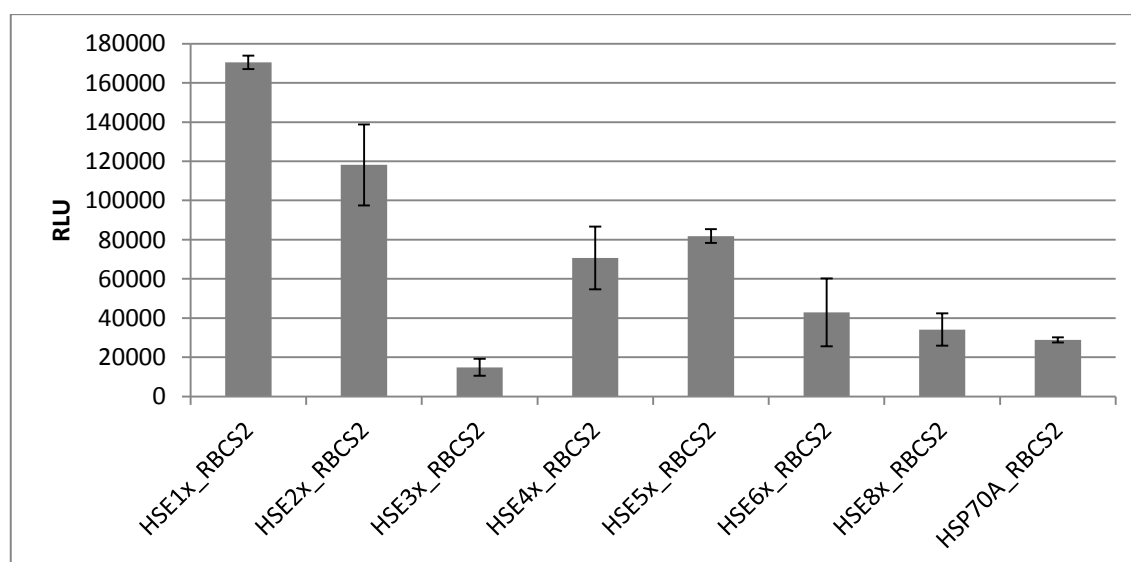


Diagramm 10: Messung1 der HSE1x bis HSE6x-RBCS2 Standardexpression und davon die Werte der drei höchsten

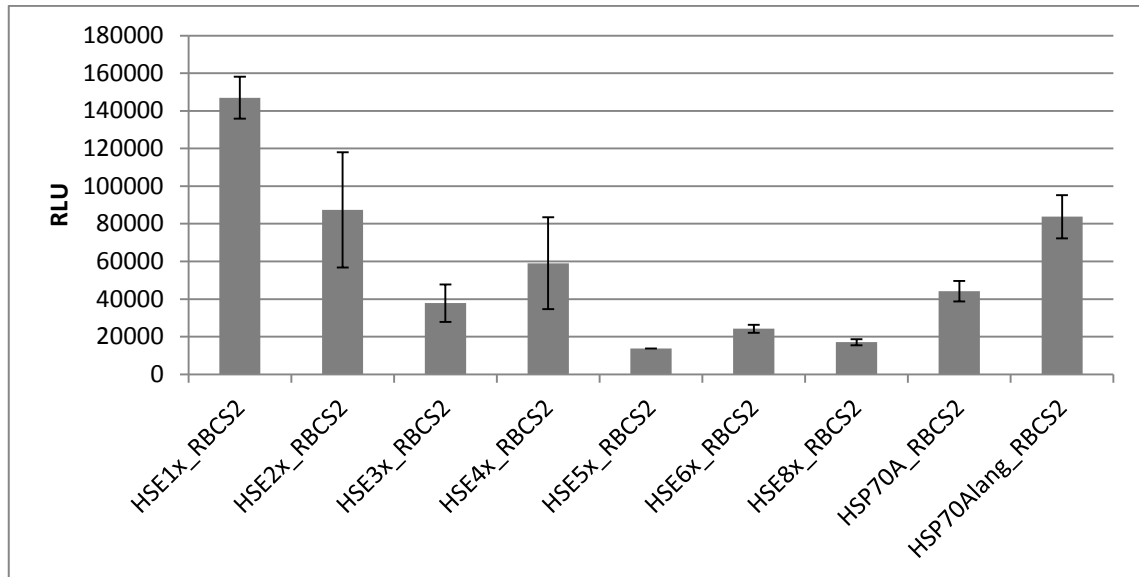


Diagramm 11: Messung2 der HSE1x bis HSE6x-RBCS2 Standardexpression und davon die Werte der drei höchsten

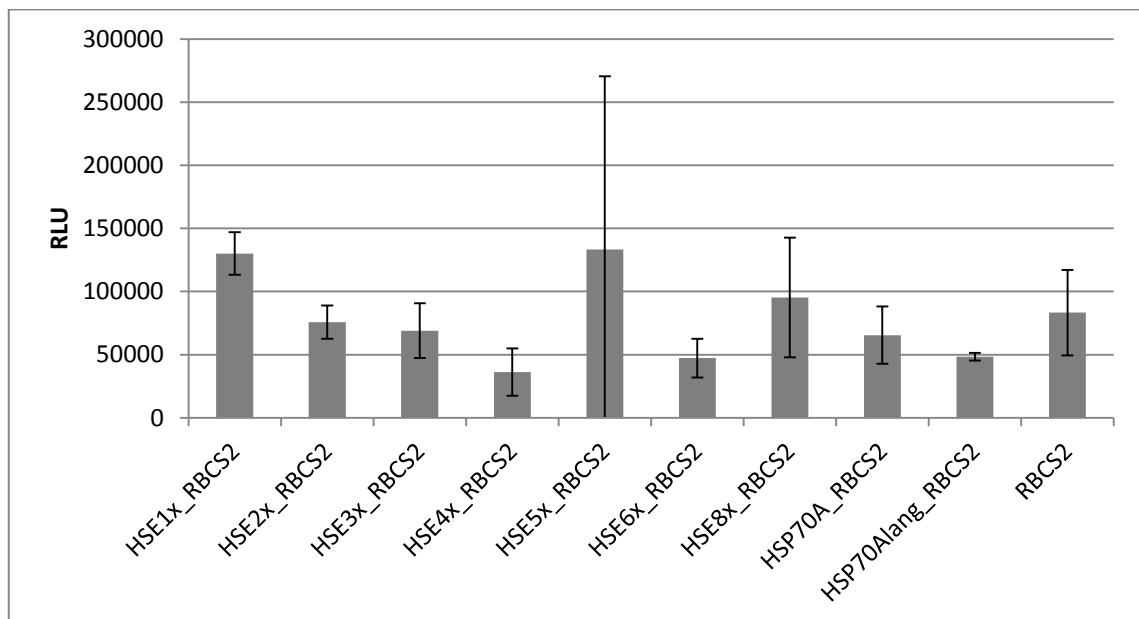


Diagramm 12: Messung3 der HSE1x bis HSE6x-RBCS2 Standardexpression und davon die Werte der drei höchsten

Die Diagramme 10-12 zeigen die Ergebnisse der Luciferase-Standardexpressionsmessung der synthetischen HSE-RBCS2 Promotorkombinationen. Dargestellt sind dabei die Mittelwerte der jeweiligen drei Klone mit höchster Expression inklusive Standardabweichung.

Die Promotorkombination HSE1x-*RBCS2* weist hier erneut die höchste Basalexpression auf. In Diagramm 12 wird ersichtlich, dass die drei Klonen mit höchster RLU bei HSE5x-*RBCS2* vergleichbar zu HSE1x-*RBCS2* sind, allerdings ist die Standardabweichung sehr hoch, was darauf hindeutet, dass nur ein einzelner Klon diese hohe Luc-Expression aufweist.

3.3.4 Standardexpression HSE1x-6x-*RBCS2* der Klone mit höchster Luciferase-Expression

Wenn man nur jene Klone mit der jeweils höchsten Luc Expression betrachtet, fällt auf, dass HSE1x und HSE2x-*RBCS2* jeweils hohe Werte aufweisen. Bei der dritten Messung konnte ein HSE5x-*RBCS2* Klon mit hoher Luc Expression identifiziert werden. Dieser HSE5x-*RBCS2* Klon konnte jedoch nicht stabil in Kultur gehalten werden, was darauf hinweist, dass die Integrationsstelle im Genom sich sehr gut auf die Expression des Transgens auswirkte, allerdings beeinflusste dies andere Vorgänge in der Zelle wohl so stark, dass sie nicht überlebensfähig war.

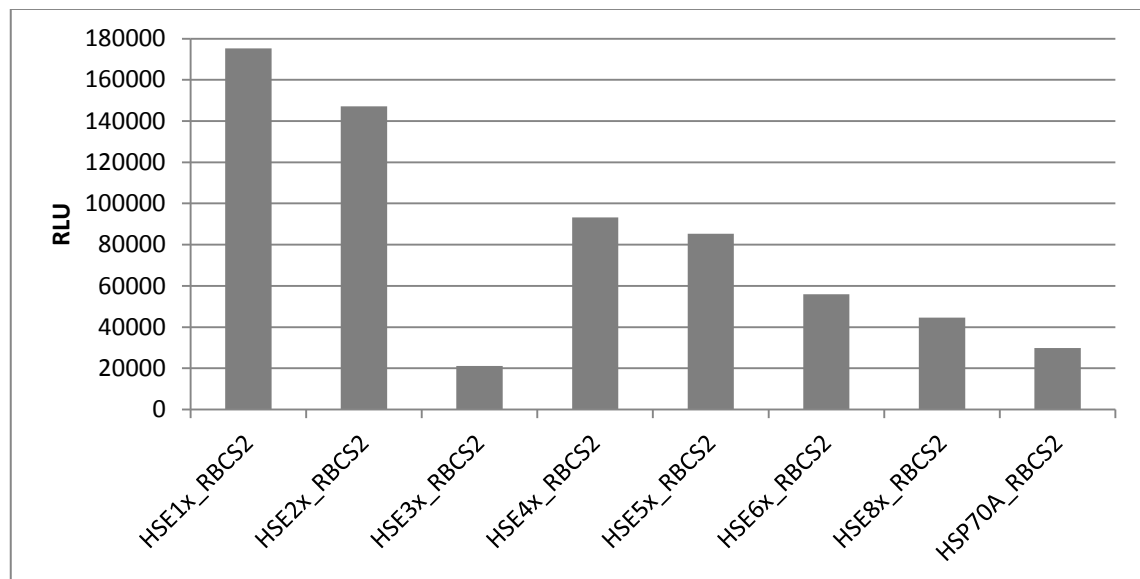


Diagramm 13: Messung1 der HSE1x bis HSE6x-*RBCS2* Standardexpression und davon der höchste Wert

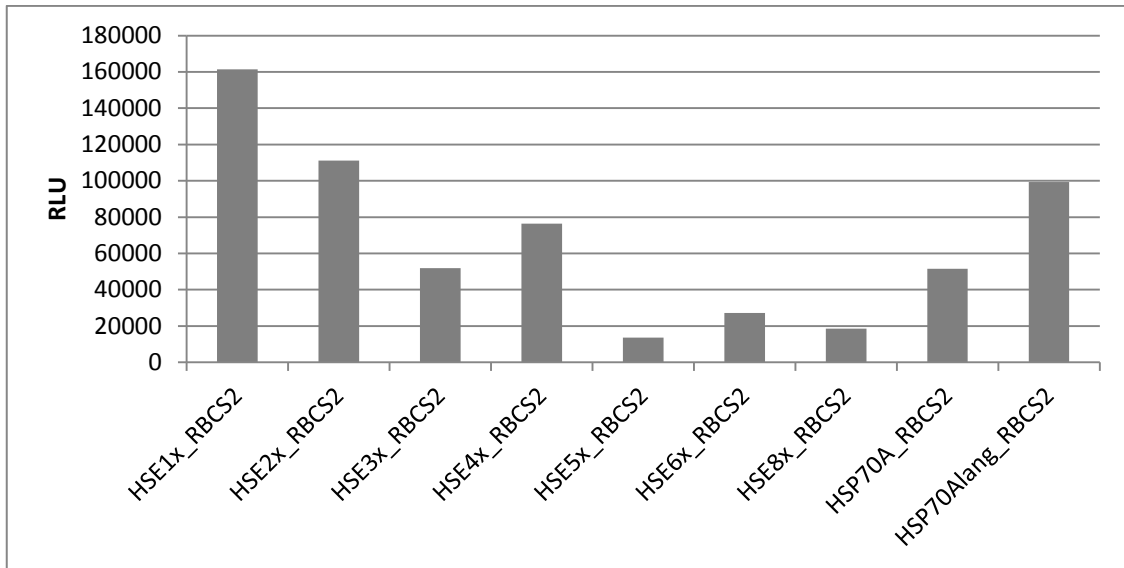


Diagramm 14: Messung2 der HSE1x bis HSE6x-RBCS2 Standardexpression und davon der höchste Wert

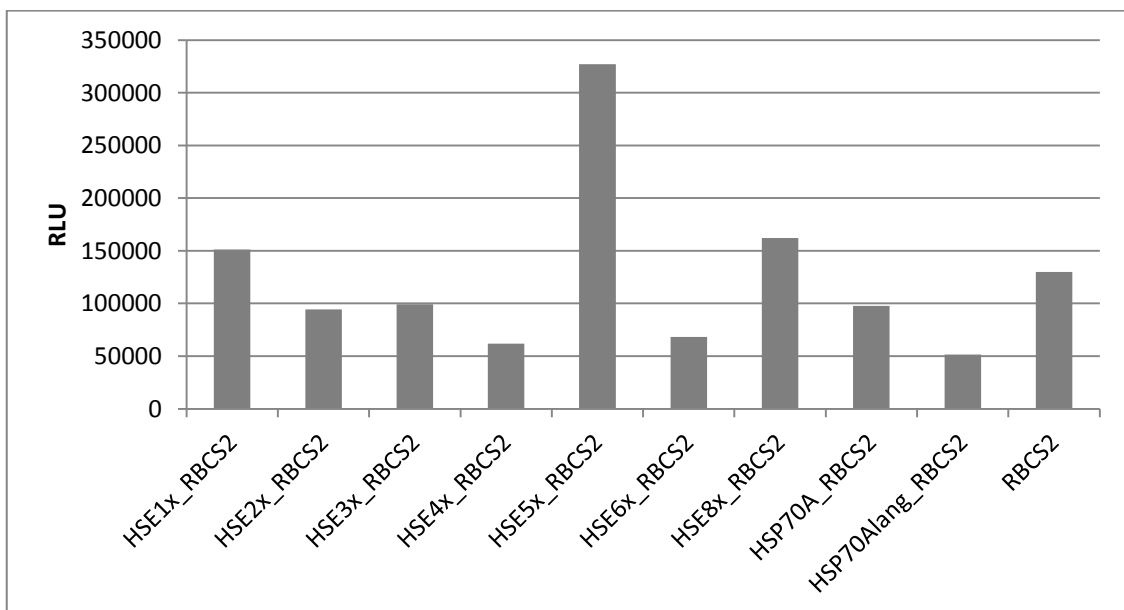


Diagramm 15: Messung3 der HSE1x bis HSE6x-RBCS2 Standardexpression und davon der höchste Wert

Die Diagramme 13-15 zeigen die Ergebnisse der Luciferase-Standardexpressionmessung der synthetischen HSE-RBCS2 Promotorkombinationen des jeweiligen Klons mit höchster Expression.

3.3.5 Darstellung der Luciferase- Standardexpression HSE1x-6x- RBCS2 mit einzelnen Messwerten

Um eine bessere Übersicht zu erhalten sind in den folgenden Tabellen die Einzelwerte in ihrer Verteilung dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass bei allen Konstrukten relativ viele Klone eine geringe Expression aufweisen. Bei HSE1x-RBCS2 sind jedoch die meisten Klone mit erhöhter Expression zu finden.

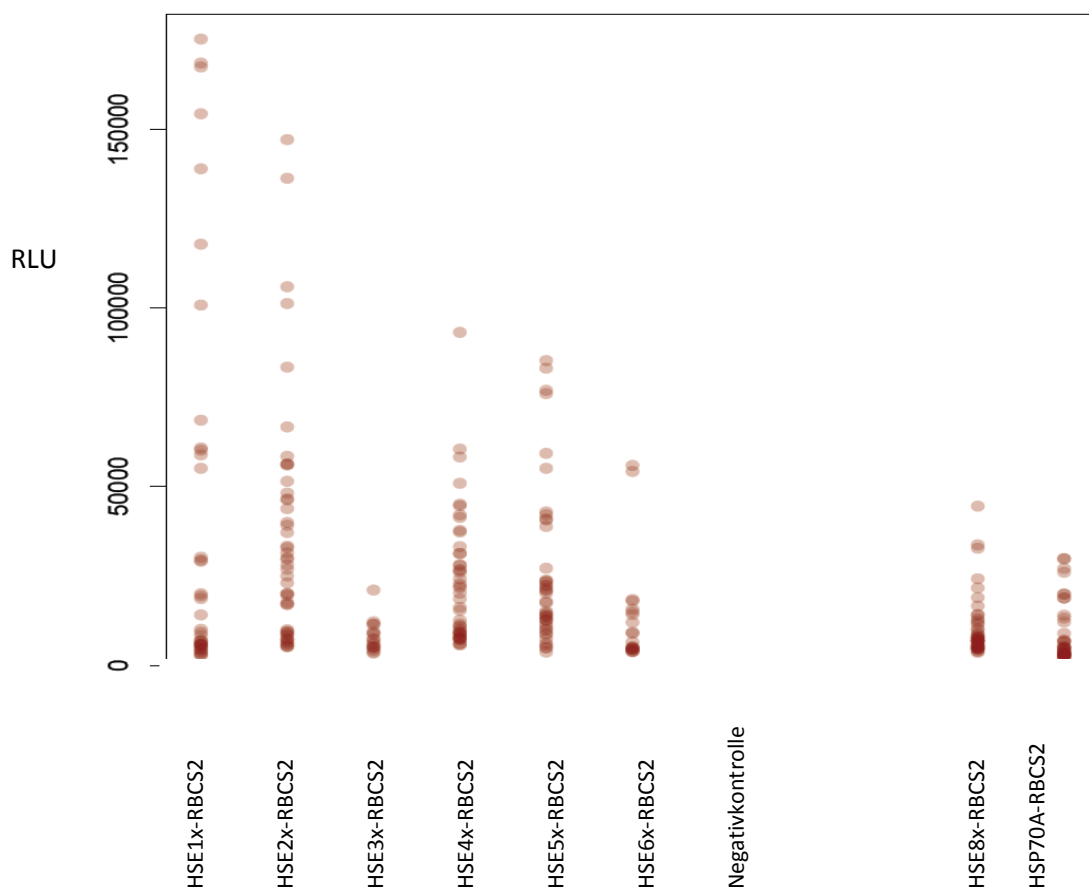


Diagramm 16: Verteilung der Einzelklone aus Messung 1-Luc Expression HSE1x-6x-RBCS2

In Diagramm 16 ist die Verteilung der einzelnen Klone der ersten Messung dargestellt. Jeder dieser Punkte entspricht einem Einzelklon. Diese Anschauung soll die großen Unterschiede durch die Positionseffekte, welche durch die zufällige Integration ins Genom auftreten, verdeutlichen.

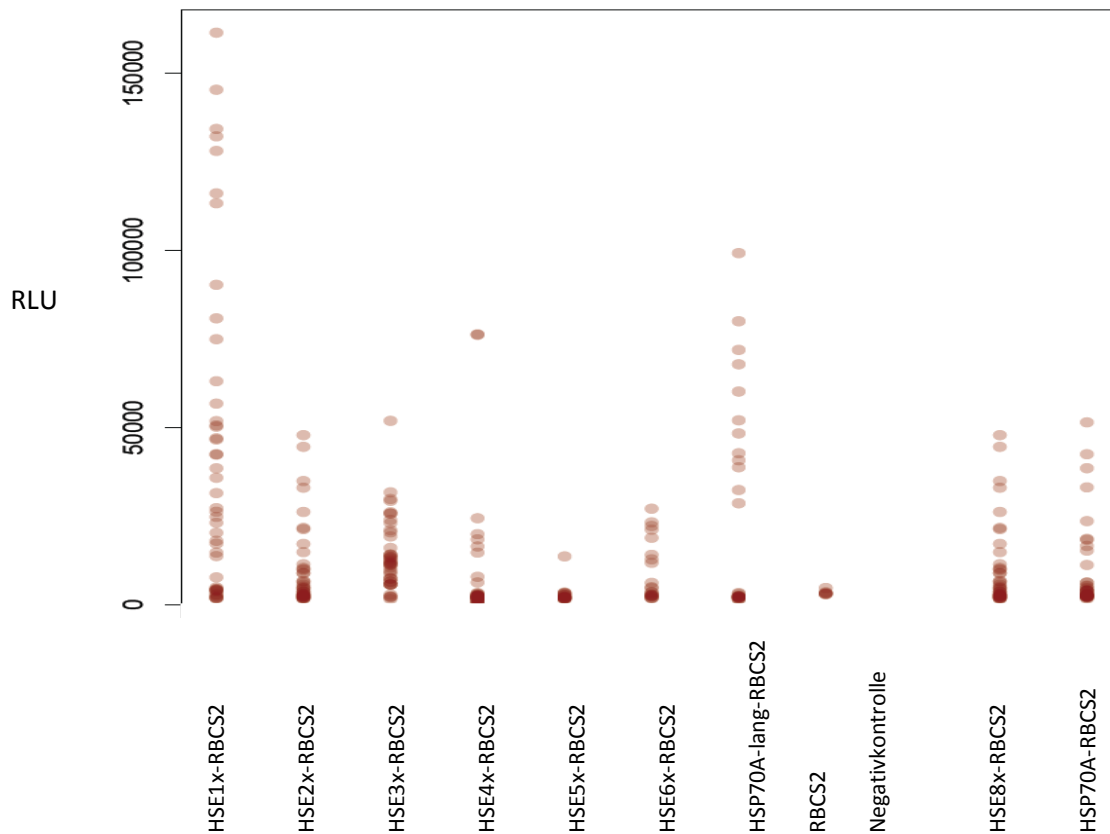


Diagramm 17: Verteilung der Einzelklone aus Messung 2-Luc Expression HSE1x-6x-RBCS2

In Diagramm 17 ist die Verteilung der einzelnen Klone der zweiten Messung dargestellt. Jeder dieser Punkte entspricht einem Einzelklon. Diese Anschauung soll die großen Unterschiede durch die Positionseffekte, welche durch die zufällige Integration ins Genom auftreten, verdeutlichen.

Ergebnisse

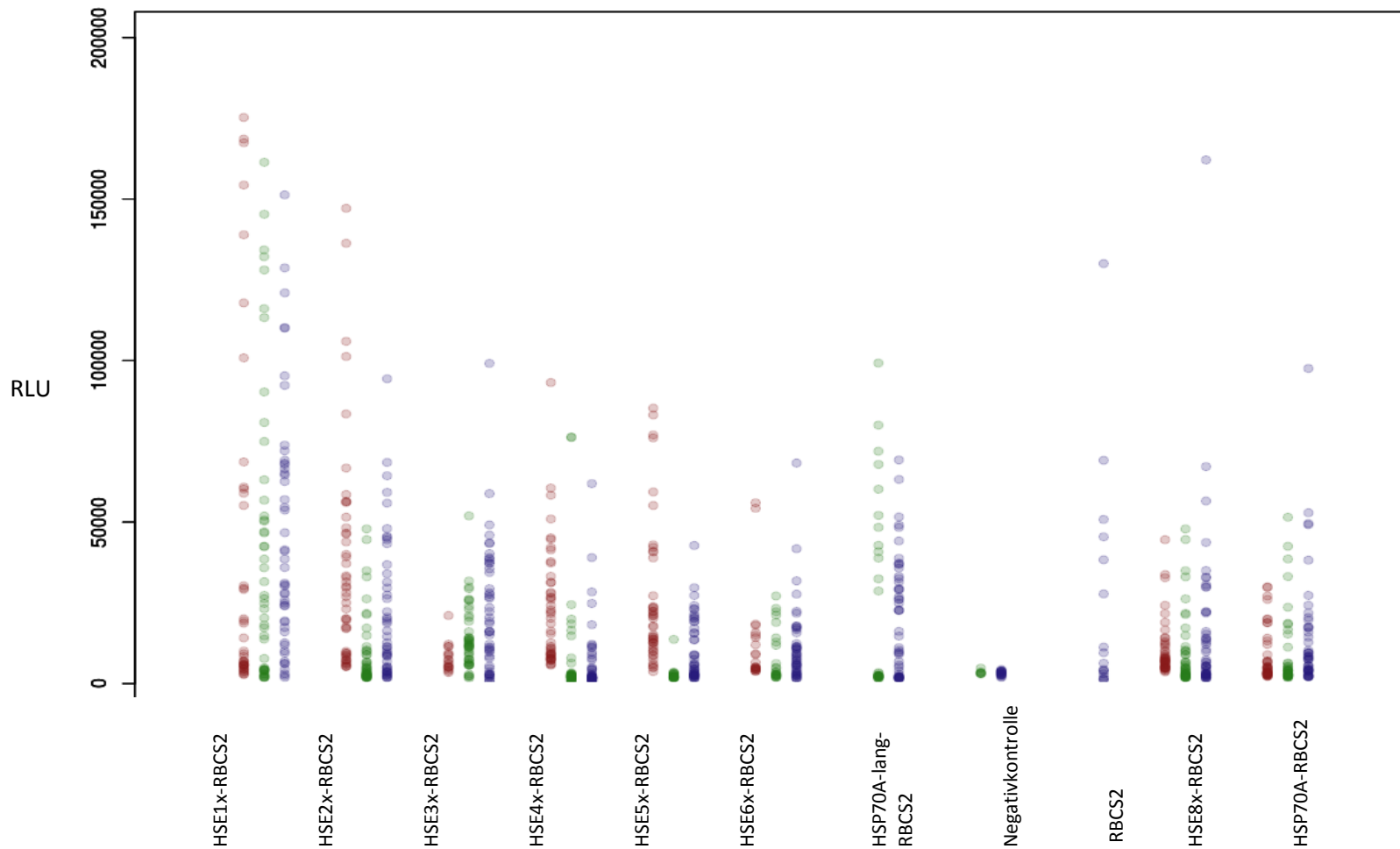


Diagramm 18: Verteilung der Einzelklone der drei Messungen-Luc Expression HSE1x-6x-RBCS2

In Diagramm 18 ist die Verteilung der einzelnen Klone aller drei Messungen dargestellt. Jeder dieser Punkte entspricht einem Einzelklon. Diese Anschauung soll die großen Unterschiede durch die Positionseffekte, welche durch die zufällige Integration ins Genom auftreten, verdeutlichen.

3.3.6 Hitzeschockexperimente HSE1x-6x-RBCS2, HSE8x-RBCS2

Nach der Messung der Grundexpression wurde die Induzierbarkeit der synthetischen HSEs in Kombination mit *RBCS2* mit Hitze getestet. Dazu wurden die jeweiligen drei Klone mit der zuvor gemessenen höchsten Basalexpression ausgewählt. Die Zellen wurden in ein auf 40°C aufgeheiztes Wasserbad gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Luc Expression unmittelbar nach dem Hitzeschock, 30 min und 1 h danach. Die Messung unmittelbar nach dem Hitzeschock (t=0 h) weist eine deutlich niedrigere Expression des Reporters auf, was wahrscheinlich auf Abnahme der Proteinmenge durch Zellschäden aufgrund des Hitzeschocks zurückzuführen ist. Anschließend steigt die Menge an Protein durch die Hitzeschockantwort wieder an. Bei den Expressionsmessungen ergab sich wenn man den Zeitpunkt 1 Stunde nach HS betrachtet, dass die Kombination HSE8x-*RBCS2* am besten und reproduzierbar durch Hitze induzierbar ist. Bei HSE1x-*RBCS2* steigt zwar die Menge an exprimierter Luciferase nach der Hitzeinduktion auch wieder an, allerdings wird dadurch kein Wert höher als jener der bereits sehr hohen Basalexpression erreicht. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Diagrammen 19-21 gezeigt.

Ergebnisse

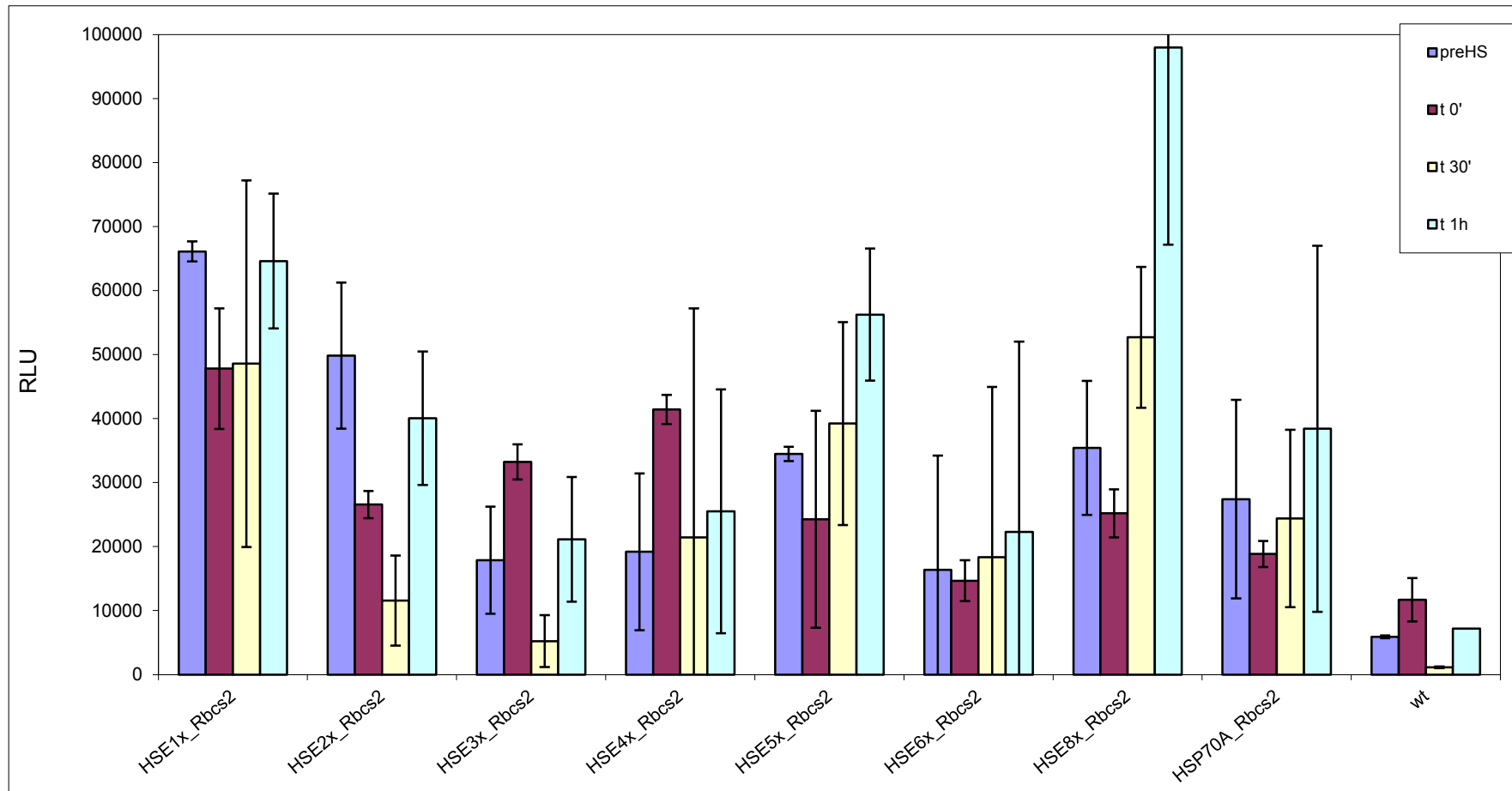


Diagramm 19: Hitzeschock Messung 1 HSE1x-6x-RBCS2

Das Diagramm 19 zeigt die erste Messung der induzierten Luciferaseexpression nach Hitzeschock bei 40°C für 30 min. Gemessen wurden dabei die drei Klone mit höchster Basalexpression. Dargestellt ist der Mittelwert der drei Klone inklusive Standardabweichung. Der WT (wt) wurde dabei als Negativ- und die Kline mit HSP70A-RBCS2 als Positivkontrolle herangezogen.

Ergebnisse

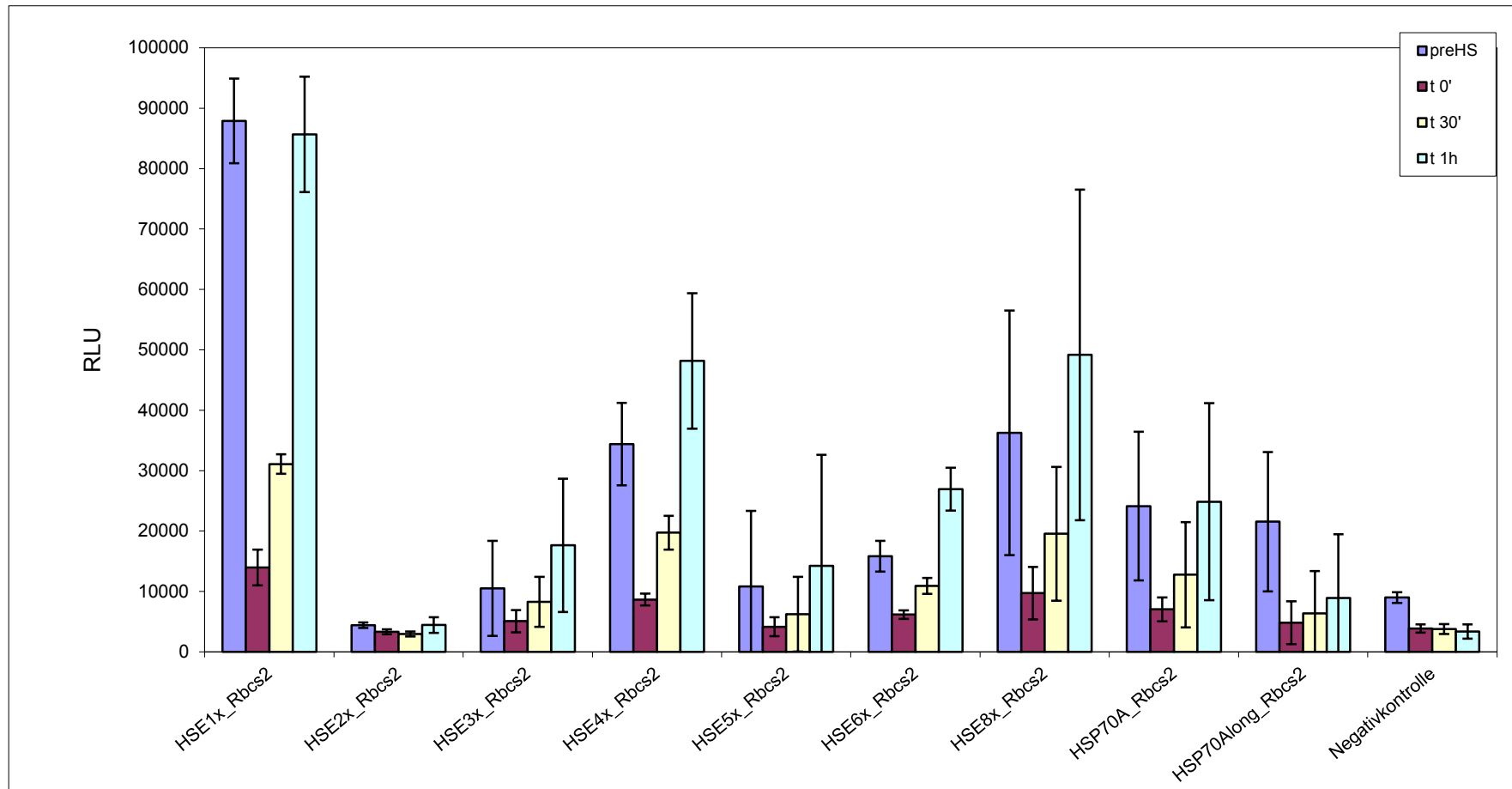


Diagramm 20: Hitzeschock Messung 2 HSE1x-6x-RBCS2

Das Diagramm 20 zeigt die zweite Messung der induzierten Luciferaseexpression nach Hitzeschock bei 40°C für 30 min. Gemessen wurden dabei die drei Klone mit höchster Basalexpression. Dargestellt ist der Mittelwert der drei Klone inklusive Standardabweichung. Der WT wurde dabei als Negativ- und die Klone mit HSP70A(lang)-RBCS2 als Positivkontrolle herangezogen.

Ergebnisse

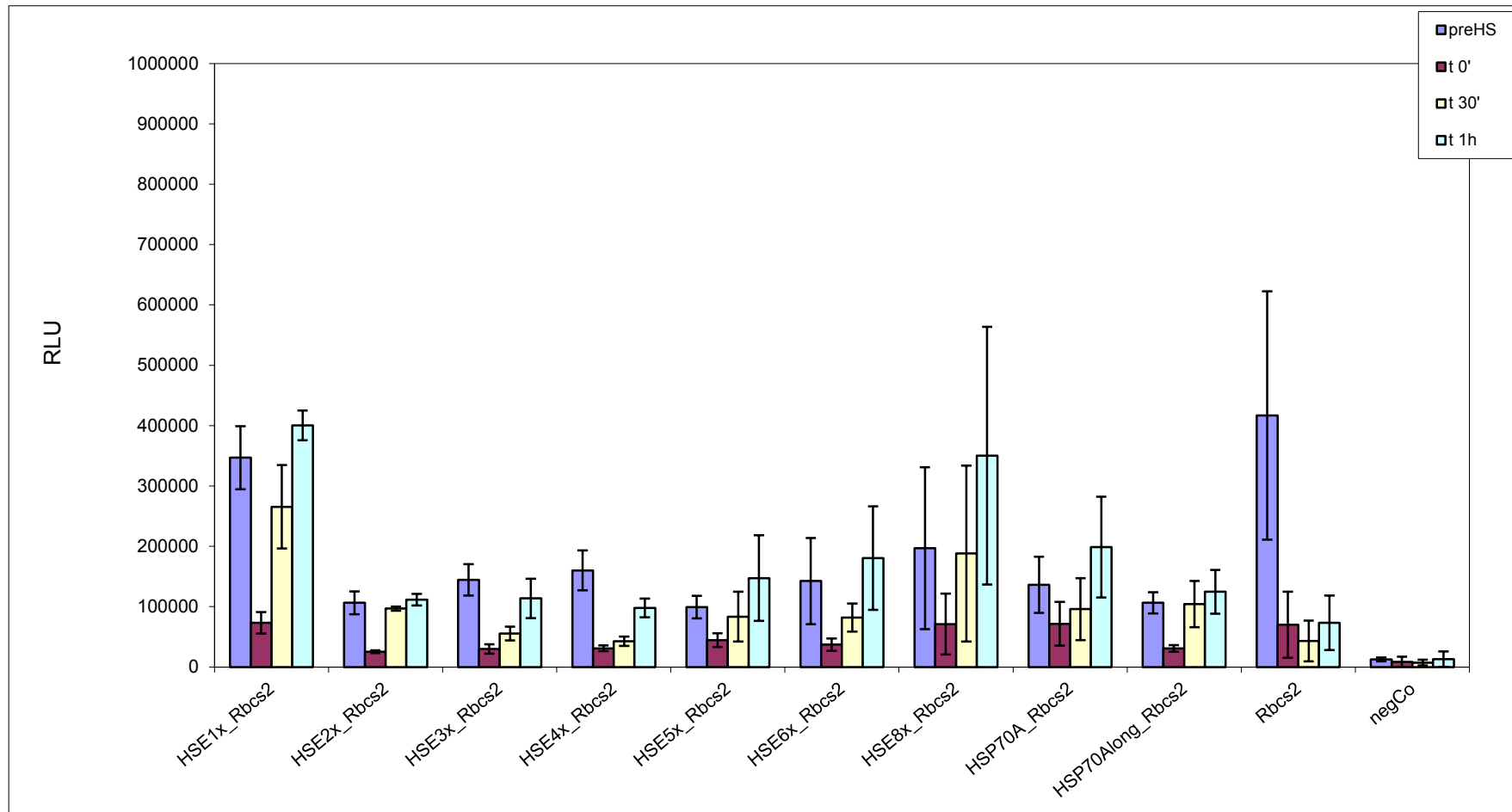


Diagramm 21: Hitzeschock Messung 3 HSE1x-6x-RBCS2

Das Diagramm 21 zeigt die dritte Messung der induzierten Luciferaseexpression nach Hitzeschock bei 40°C für 30 min. Gemessen wurden dabei die drei Klone mit höchster Basalexpression. Dargestellt ist der Mittelwert der drei Klone inklusive Standardabweichung. Der WT wurde dabei als Negativ (negCo)- und die Klone mit HSP70A(lang)-RBCS2 als Positivkontrolle herangezogen.

3.4 HSE8x Promotorkombinationen - Messung der Basalexpression

Für Anwendungen bei denen sich eine hohe Proteinmenge in gewissen Stoffwechselwegen aufgrund von Toxizität negativ auf das System auswirken kann, sind starke induzierbare Promotoren jenen die basal hoch exprimieren vorzuziehen. Deshalb wurde das synthetische Hitzeschockelement in achtfacher Wiederholung, welches stark erhöhte induzierbare Expression aufweist noch weiter analysiert. Dazu wurden zusätzlich zu HSE8x-RBCS2 noch weitere Varianten kloniert. Zu diesem Zweck wurde pXX186 mit *NheI* und *SacI* verdaut und anschließend wurden mittels *Klenow* Fragment Enden entfernt und religiert. Daraus entstand das Plasmid pMCI50. Das Plasmid pMCI52 wurde durch die Amplifizierung des *RBCS2* Introns 1 mit den Primern Intron pXX186 forward und reverse und anschließender Ligation mit pXX186 über *XhoI/NheI* kloniert. Die entstandenen Plasmide pMCI50 und 52 wurden abschließend mit pXX208 fusioniert, daraus entstanden die Plasmide pMCI53 und pMCI55. Tabelle 15 zeigt die Plasmide mit HSE8x Varianten.

Tabelle 15: Klonierung HSE8x

Plasmidname	Fusion	Promotor
pMCI53	pMCI50+pXX208	<i>RBCS2</i>
pMCI55	pMCI52+pXX208	HSE8x

Ergebnisse

In folgenden Abbildungen sind die Plasmide nochmals graphisch dargestellt.

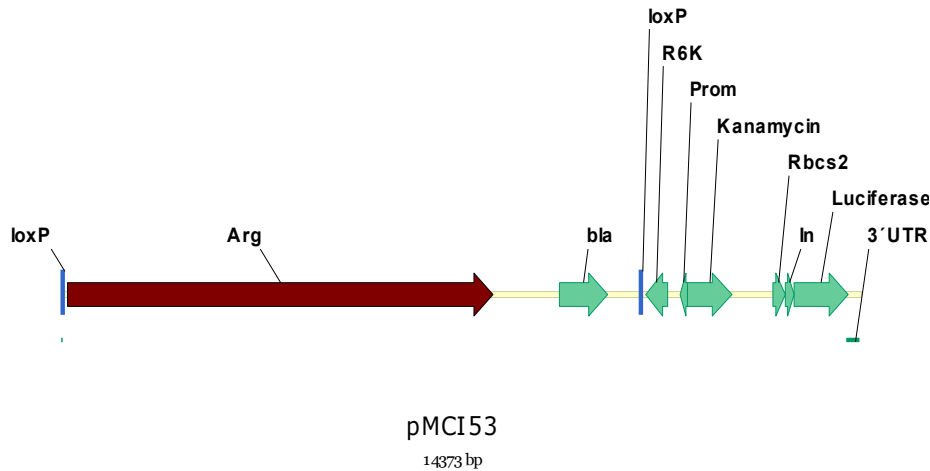


Abbildung 7: Plasmid mit RBCS2 Promotor

Es ist das Plasmid pMCI53 gezeigt, welches durch Ligation des RBCS2 Introns mit dem Plasmid pXX186 und anschließender Cre-loxP Fusion mit pXX208, generiert wurde. Das Plasmid enthält die loxP Erkennungssequenz für die Fusion mittels Cre Rekombinase (loxP), den R6ky Replication Ori (R6K) für die Klonierung in *E. coli*, ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotika Kanamycin (Kanamycin) und eines gegen Ampicillin (bla) den HSE8x Promotor, Renilla Luciferase (Luciferase) als Reporter und Arginin als Selektionsmarker (Arg) in *C. reinhardtii*

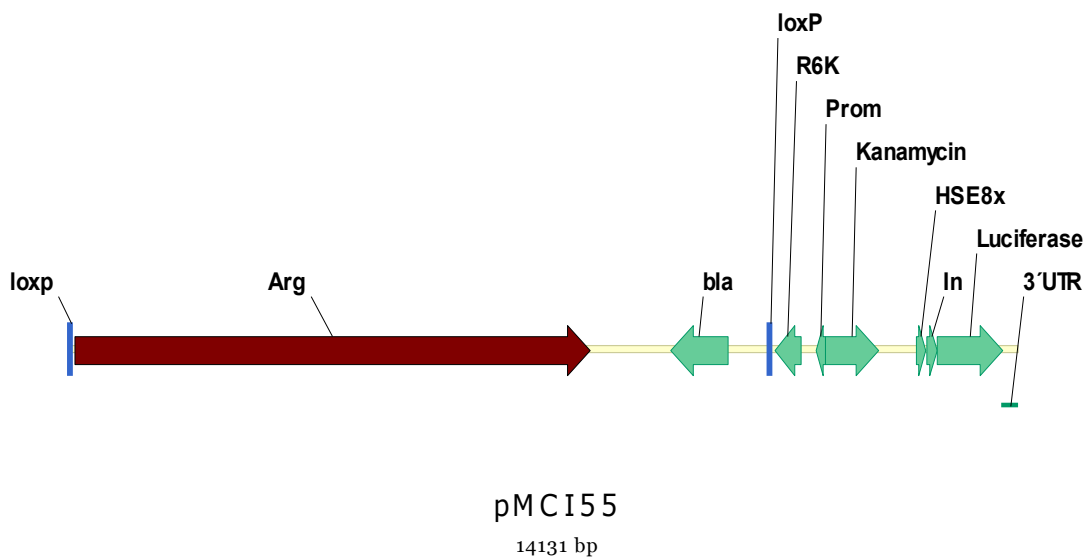


Abbildung 8: Plasmid mit HSE8x Promotor

Es ist das Plasmid pMCI55 gezeigt. Dies enthält die loxP Erkennungssequenz für die Fusion mittels Cre Rekombinase (loxP), den R6ky Replication Ori (R6K) für die Klonierung in *E. coli*, ein Gen für die Resistenz gegen das Antibiotika Kanamycin (Kanamycin) und eines gegen Ampicillin (bla) den RBCS2 Promotor, Renilla Luciferase (Luciferase) als Reporter und Arginin als Selektionsmarker (Arg) in *C. reinhardtii*

Ergebnisse

Die Messung der Luciferase Expression erfolgte hierbei erneut wie im Methodenteil unter 5.2.23 beschrieben mittels Plattenlesegerät. Die Ergebnisse der Messungen sind in folgenden Diagrammen gezeigt.

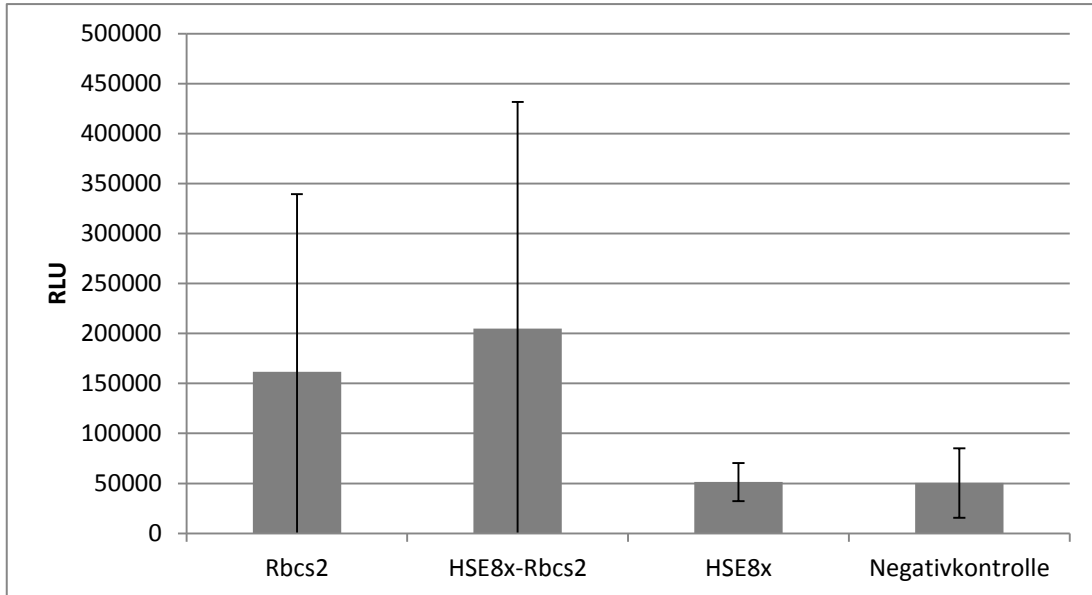


Diagramm 22: Luc-Messung 1- HSE8x 20s

Das Diagramm 22 zeigt das Ergebnis der basalen Luciferaseexpressions-Messung mit den Promotoren HSE8x, HSE8x-RBCS2. Der Promotor RBCS2 diene als Positiv- und das Plasmid pXX208 (enthält nur Arg und keine Luc) als Negativkontrolle. Es wurden je 96 Klone pro Konstrukt gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert inklusive Standardabweichung.

Ergebnisse

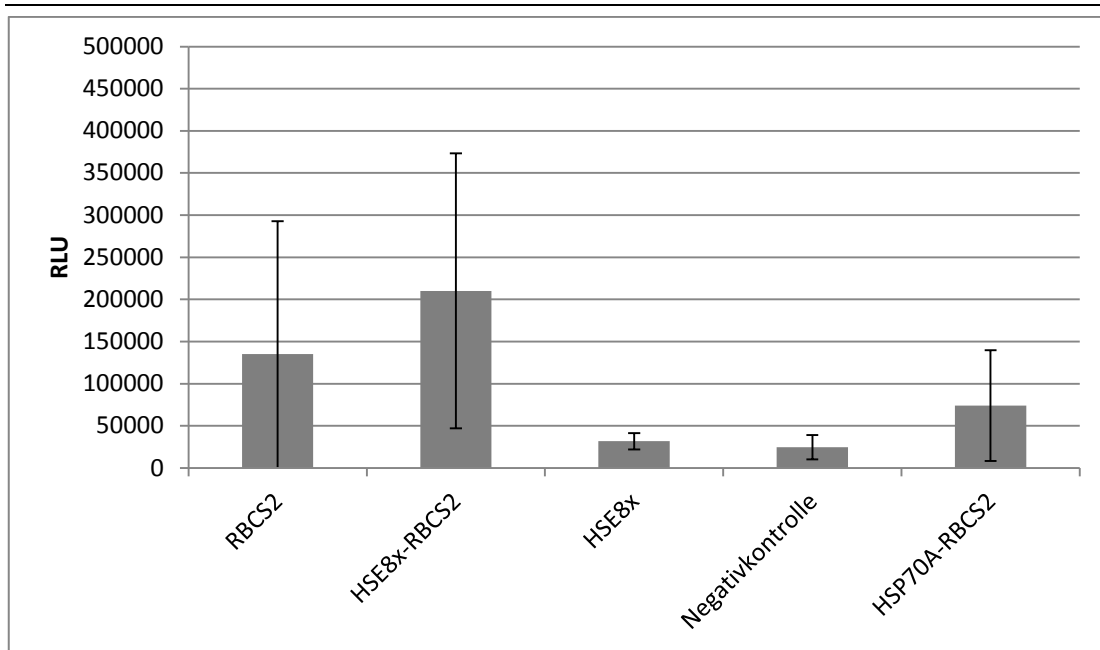


Diagramm 23: Luc-Messung 2- HSE8x 20s

Das Diagramm 23 zeigt die Reproduktion der Luciferaseexpressions-Messung mit den Promotoren HSE8x, HSE8x-RBCS2. Der Promotor RBCS2 diente als Positiv- und das Plasmid pXX208 (enthält nur Arg und keine Luc) als Negativkontrolle. Es wurden je 96 Klone pro Konstrukt gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert inklusive Standardabweichung.

Wie aus den soeben dargestellten Messergebnissen der HSE8x Promotorkombinationen in den Diagrammen 22 und 23 ersichtlich wird, ist die neuartige Promotorkombination HSE8x-RBCS2 hierbei jene mit der stärksten mittleren Basalexpression an Luciferase. HSE8x ohne zusätzlichen Promotor führte zu keiner detektierbaren Standardexpression.

3.5 Hitzeschockmessungen des Promotorkonstrukts HSE8x-RBCS2

Nachdem die Promotorkombination HSE8x-RBCS2 nach Induktion mit Hitze reproduzierbar eine Steigerung der Expression des Reporters Luciferase zur Folge hatte, sollte dies weiter untersucht werden. Dazu wurde der Hitzeschock bei 40°C wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Parameter sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Dabei wurde als Temperatur für den Hitzeschock immer 40°C gewählt. Es wurde über einen Zeitraum von bis zu 5 h gemessen. Der HS erfolgte für 15, 30 oder 60 min.

Tabelle 16: Bedingungen Hitzeschockexperimente

Temperatur [°C]	Zeit HS [min]	Regenerationsphase [h]	Messzeitraum[h]
40	30	3,5	3,5
40	15	4	4
40	30	4	4
40	15	2	5
40	30	2	5
40	60	2	5

Die folgenden Diagramme 24 und 25 zeigen die ausgewählten Ergebnisse der Messung nach 15 min/40°C und 30 min/40°C Hitzeschock. Es wurde über einen Regenerationszeitraum von 3,5 bzw. 4 h gemessen.

Ergebnisse

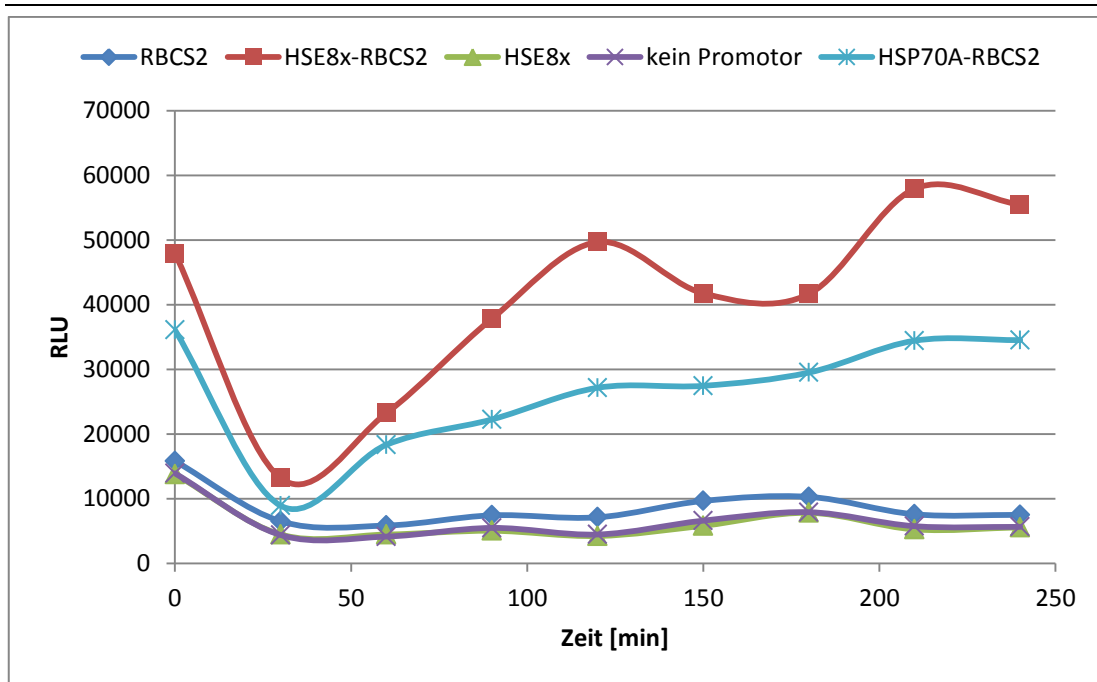


Diagramm 24: HS15min, Lumineszenzkinetik über 4 h

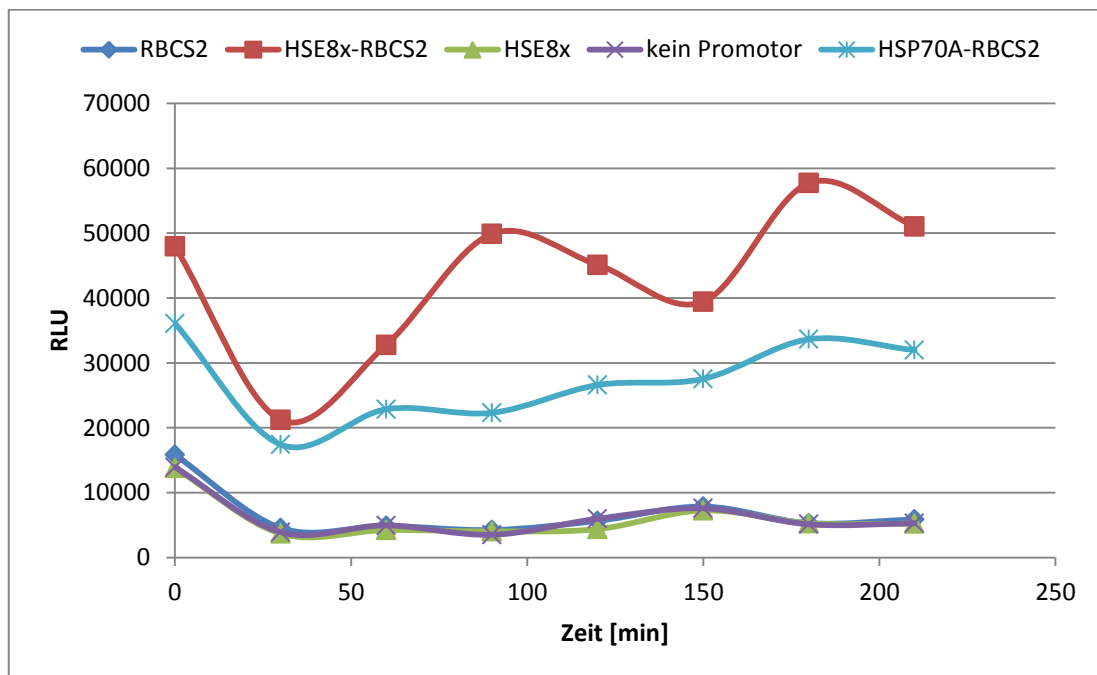


Diagramm 25: HS 30min, Lumineszenzkinetik über 3,5 h

In den Diagrammen 24 und 25 ist der Verlauf der Luciferaseexpression der drei Klone mit der höchsten Proteinmenge nach dem Hitzeschock dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Proteinmenge zunächst abnimmt und anschließend stark ansteigt. Das Maximum an Protein wird laut vorliegenden Messungen nach ca. 3 bis 4 h erreicht.

Ergebnisse

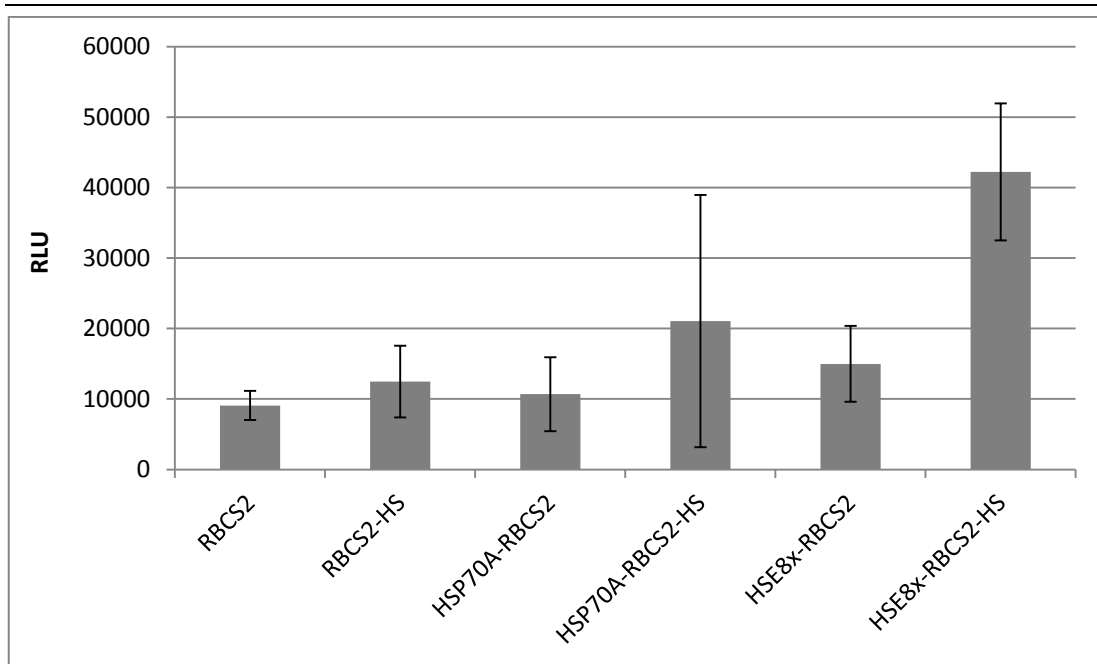


Diagramm 26: Zusammenfassung der Plattenlesermessungen HSE8x

Das Diagramm 26 zeigt die Luc Expressionen der drei Klone mit der höchsten gemessenen Luciferaseexpression vor und 1 h nach dem Hitzeschock (HS).

Dabei ist zu erkennen, dass HSE8x-RBCS2 nach dem Hitzeschock eine um das bis zu dreifach erhöhte Luc-Expression im Vergleich zu HSP70A-RBCS2 aufweist.

3.6 Chromatinimmunopräzipitations-Assay

Der ChIP-Assay diente dazu festzustellen, ob der *C. reinhardtii* interne Hitzeschockfaktor1 an die synthetischen HSEs bindet. Damit sollte geklärt werden, ob die Hitzeinduktion der Promotorelemente auf der konservierten Hitzeschockantwort der Zelle basiert. Der Assay wurde wie im Methodenteil unter 5.2.29 beschrieben laut Protokoll in der Publikation von Strenkert et al 2011 durchgeführt (Strenkert et al., 2011a). Dabei erfolgten zunächst das *Crosslinking* des Chromatins mittels Formaldehyd und anschließend die Zellyse und die Fragmentierung der DNA durch eine Ultraschallsonde. Der entsprechende Antikörper wurde anschließend mit gebundener DNA über Protein A-Sepharose Kügelchen aufgereinigt. Nach der Elution erfolgten die Umkehr des *Crosslinkings* und die Phenol-Chloroform Extraktion der zuvor gebundenen DNA. Diese DNA konnte anschließend mittels PCR analysiert werden. Verwendete Antikörper für den ChIP waren zum einen jener gegen H3 Histon, um die prinzipielle Funktionsweise des Assay testen zu können und zum anderen der Antikörper gegen HSF1. Mittels PCR mit den Primern „HSEsynthetisch“ *for* und *rev* konnte bei der gebundenen DNA an den Antikörper HSF1 die zu erwartende Fragmentgröße bei 143 bp, die der Länge des HSE8x entspricht, nachgewiesen werden. Ebenfalls positiv getestet wurde *HSP70A* mit den Primern *HSP70A for* und *rev*. Das Ergebnis des ChIP Assay mit HSE8x-RBCS2 ist in folgendem Gelbild dargestellt.

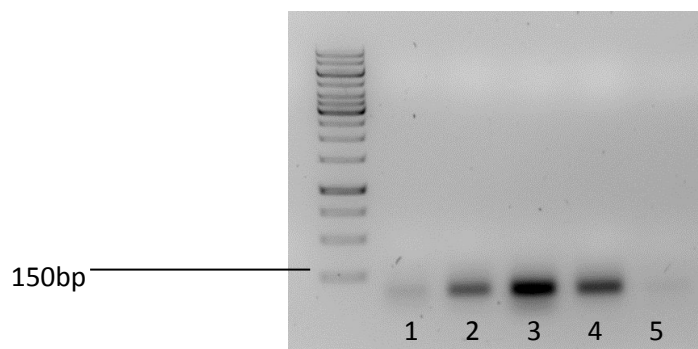


Abbildung 9: ChIP Assay mit pMCI77- HSE8x-RBCS2

Im Abbildung 9 ist das Ergebnis des ChIP Assay gezeigt. Aufgetragen wurden dabei folgende Proben:

- 1 Negativkontrolle ohne DNA
- 2 AK H3 (1:10) pMCI77 (HSE8x-RBCS2)
- 3 AK H3
- 4 AK HSF1 pMCI77 (HSE8x-RBCS2)
- 5 Negativkontrolle pMCI153 (RBCS2)

Wie aus der Abbildung 9 ersichtlich wird konnte in der Gelspur 4 die Bindung des HSF1 an das ca. 140bp lange HSE8x synthetische DNA-Fragment nachgewiesen werden. Es wurde zunächst, wie aus den Spuren 2 und 3 ersichtlich wird, die prinzipielle Funktionsweise des Assays über die Bindung des H3 Antikörpers bestätigt. Außerdem dienten die PCR ohne DNA und die genomische DNA aus pMCI53 als Negativkontrollen.

3.7 HSE-Promotorkombinationen-HS Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen

Die Hitzeinduktion wurde bei den bisherigen Messungen bei 40°C für 30 min durchgeführt. Um die ideale Temperatur und Zeit des Hitzeschocks für die neuartigen Promotorkonstrukte, welche synthetische HSEs enthalten zu testen, wurde anhand der vorliegenden Daten für endogene HSP von *Chlamydomonas reinhardtii* (Tanaka et al., 2000; Kobayashi et al., 2014) eine Temperaturspanne ausgewählt. Die Hitzeinduktion wird dabei bei 36-39°C mit vorangegangener Kultivierung bei 25°C und ein Absterben der Algenzellen bei 42°C beschrieben. In einer vorliegenden HS Studie zu Gaussia-Luciferase Expression wurden sogar 47°C für den Hitzeschock beschrieben (Shao et al., 2008). Aufgrund der vorliegenden Daten von Ortner und Kollegen 2015 zu HSEs in tierischen Zellkulturen kann davon ausgegangen werden, dass mithilfe der synthetischen HSE nach Hitzeschock mit hohen Temperaturen und geringen Einwirkzeiten sowie mit niedrigen Temperaturen und erhöhter Einwirkzeit gute Expressionsraten erzielt werden konnten (Ortner et al., 2015). Als Hitzeschockbedingungen wurden deshalb folgende Parameter gewählt: 36°C/2 h, 38°C/ 1 h und 40°C/30 min. Anschließend erfolgte die Messung der drei Klone mit höchster Basalexpression unmittelbar nach dem Hitzeschock und nach einer Regenerationsphase von 2 h, 4 h, 6 h und 24 h (Ergebnisse nicht gezeigt). Es konnte festgestellt werden, dass HSE8x-RBCS2 erneut am besten durch Hitze induziert werden kann. Bei 40°C konnte wie bereits zuvor im Ergebnisteil unter 3.5 gezeigt die höchste Expression 3,5-4 h nach dem HS gemessen werden. Der Hitzeschock bei 38°C für 1 h verhält sich ähnlich zu jenem bei 40°C. Bei den Bedingungen 36°C/2 h erfolgt unmittelbar nach dem HS ein starker Anstieg der Luc Expression und anschließend fällt diese schnell wieder auf Normalzustand zurück. Da die beiden Messungen der Expression nach dem HS bei 36°C und 38°C nur einmal durchgeführt wurden lässt sich dabei allerdings keine exakte Aussage über mögliche Einflüsse der unterschiedlichen Einwirkzeiten und Temperaturen treffen. Diese Messung müsste zunächst reproduziert werden, um mögliche optimierte Bedingungen des HS und damit verbundene Expressionssteigerungen ableiten zu können.

3.8 tagRFP als neuer Reporter

Um die sich überlappenden Fluoreszenzbereiche von GFP und Chlorophyll zu umgehen und weitere Analysemöglichkeiten zu haben wurde tagRFP als neuer Reporter etabliert. Mithilfe dieses Fluoreszenzproteins sollte die Einzelzellmessung mittels FACS möglich gemacht werden und auch die Messung am Plattenlesegerät und das Aufnehmen von fluoreszenzmikroskopischen Bildern sollten als zusätzliche Methoden zur Fremdproteinanalyse etabliert werden.

3.8.1 Klonierung des tagRFP Reporters für die Expression im Kerngenom

Um tagRFP für die Kernexpression zu etablieren wurde zunächst das aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* gewonnene Gen tagRFP mithilfe der Software OligoCreator 202 an die Codon Usage von *C. reinhardtii* angepasst und das Gen bei GeneArt® synthetisiert. Anschließend wurde das synthetische Gen mittels Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten und mit dem Plasmid pXX37 ligiert.

Daraus entstanden in weiterer Folge die Plasmide pMCI76-79, welche in folgender Tabelle kurz beschrieben sind.

Tabelle 17: Klonierung von tagRFP

Plasmidderivat Name	Ursprungsplasmid	Promotor
pMCI76	pXX37	HSP70A-RBCS2
pMCI77	pXX37	HSE8x-RBCS2
pMCI78	pXX37	RBCS2
pMCI79	pXX37	HSE8x

Tabelle 17 zeigt die Plasmide mit dem Reporterprotein tagRFP. pMCI76 dient dabei als Positivkontrolle und enthält die bisher stärkste Promotorkombination HSP70A-RBCS2 (Schroda et al., 2000). Beim ebenfalls als Kontrolle verwendeten Plasmid pMCI78 dient RBCS2 als Promotor. pMCI77 und 79 enthalten acht Wiederholungen des synthetischen Hitzeschockelements.

In folgender Abbildung ist pMCI77 mit den einzelnen Features als Beispiel dargestellt.

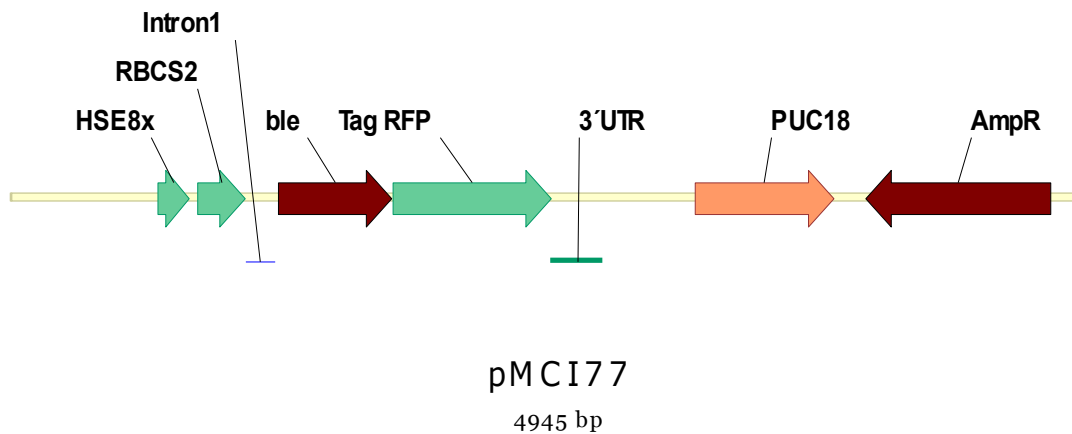


Abbildung 10: tagRFP Plasmid

Die Abbildung 10 zeigt das Plasmid pMCI77, welches den *puc18* Replication Origin (PUC18) für die Klonierung in *E. coli*, das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotika Ampicillin (*AmpR*), die Promotorkombination HSE8x-RBCS2 und das Fusionsprotein ble-tagRFP, welches die Resistenz gegen Zeocin und den Reporter tagRFP enthält.

3.8.2 Fluoreszenzmikroskopie des Reporters tagRFP für die nukleäre Expression

Das Reportergen tagRFP sollte im ersten Schritt mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Dazu wurden die Einstellungen wie im Methodenteil unter 5.2.25 beschrieben verwendet. Die folgenden Bilder zeigen Aufnahmen von zwei Klonen, welche die Promotoren *HSP70A-RBCS2* bzw. *HSE8x-RBCS2* enthalten und den Wildtypstamm *302cw15arg7*.

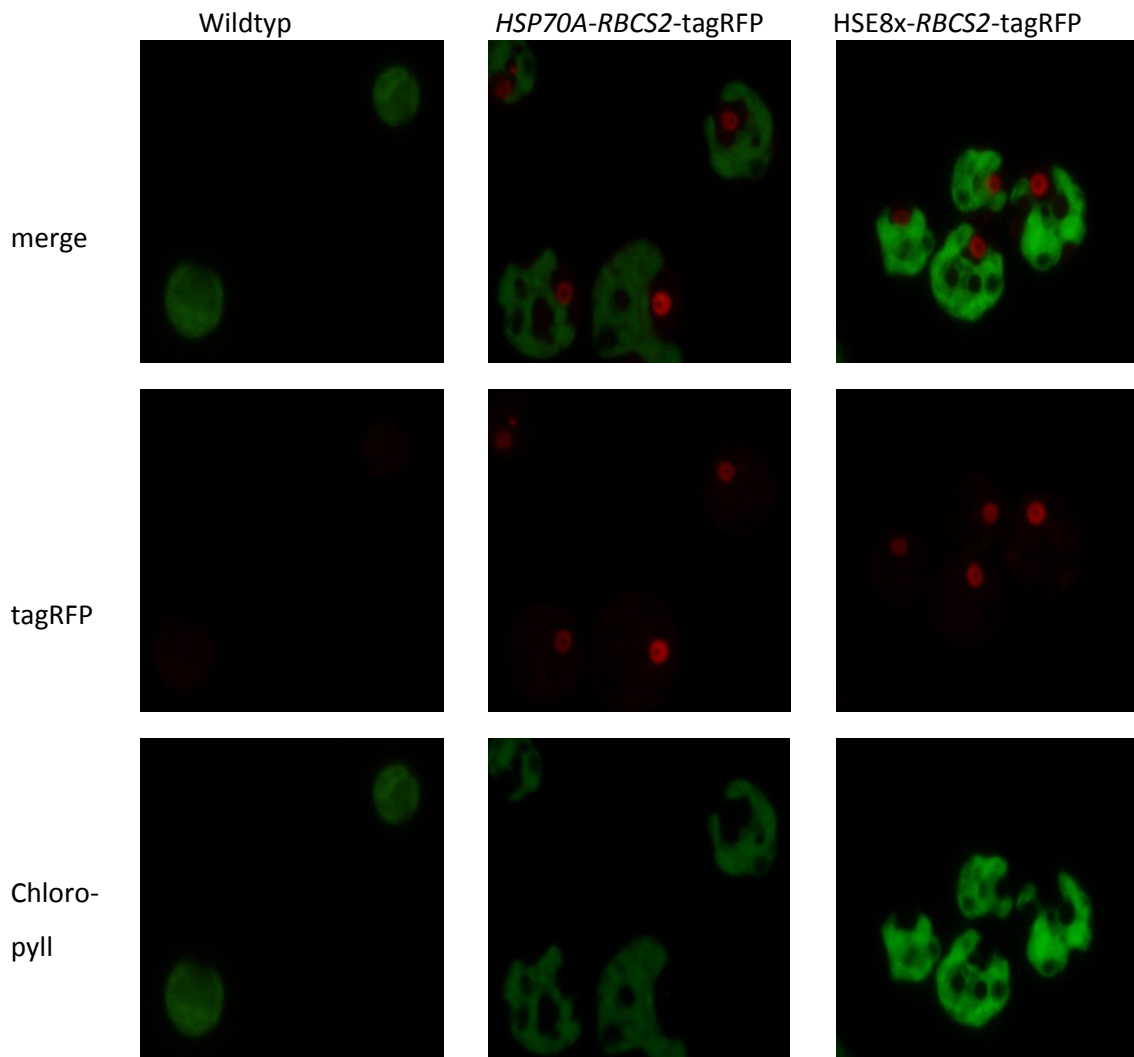


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen tagRFP (Kothgassner, 2013)

In Abbildung 11 sind Fluoreszenzbildaufnahmen zweier Klone mit den Promotoren *HSP70A-RBCS2* und *HSE8x-RBCS2* dargestellt. Als Negativkontrolle dienten Aufnahmen des Wildtypstamms *302cw15arg7* (cc4350). Dabei wurden zunächst die Autofluoreszenz des Chlorophylls und anschließend die tagRFP Fluoreszenz im Kern mit den entsprechenden Filtern aufgenommen. Ganz oben dargestellt ist eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder.

Daraus wird ersichtlich, dass tagRFP wie zu erwarten im Kern der Grünalge lokalisiert ist und bei lebende Zellen keine Überlappung der Autofluoreszenz mit jener von tagRFP auftritt. Außerdem konnte neben der prinzipiellen Funktionalität auch die Anwendbarkeit von unterschiedlichen Promotoren gezeigt werden.

3.8.3 Plattenlesermessungen Kern-tagRFP

Um tagRFP im Kerngenom der Alge für die Reportergenanalyse verwenden zu können, sollte die Messung der Fluoreszenz mittels Plattenlesegerät MithrasLB940 der Firma Berthold etabliert werden. Es wurden die *Counting Time* des Detektors und die Lampenintensität variiert und die im Materialteil unter 5.1.10 angegebenen Filter für die tagRFP Anregung (540 nm/25x) und Emission (580 nm/25) verwendet. Die Messung erfolgte in schwarzen 96- Well- Platten. Vor der Messung wurden die Algen 10 s im Plattenlesegerät geschüttelt. Ziel der vorliegenden Etablierung war es für die leeren wells, TAP-Medium und WT eine möglichst geringe Abweichung zu sehen und den Abstand zwischen den vorliegenden Negativkontrollen und den Algenproben möglichst groß zu halten. Im ersten Schritt wurde die *Counting Time* variiert. Da die vom Hersteller vorgegebene Messzeit zwischen 0,1-0,5 s standardmäßig verwendet wird, wurde dieser Bereich für die Messungen herangezogen. Das *Screening* wurde mit den identen Algenkulturen mehrmals wiederholt, wobei starke Schwankungen festgestellt wurden. Wie aus den Diagrammen 27 und 28 ersichtlich wird, variierten bei gleichen Einstellungen die Werte für TAP stark und lagen zeitweise über jenen der tagRFP Klone.

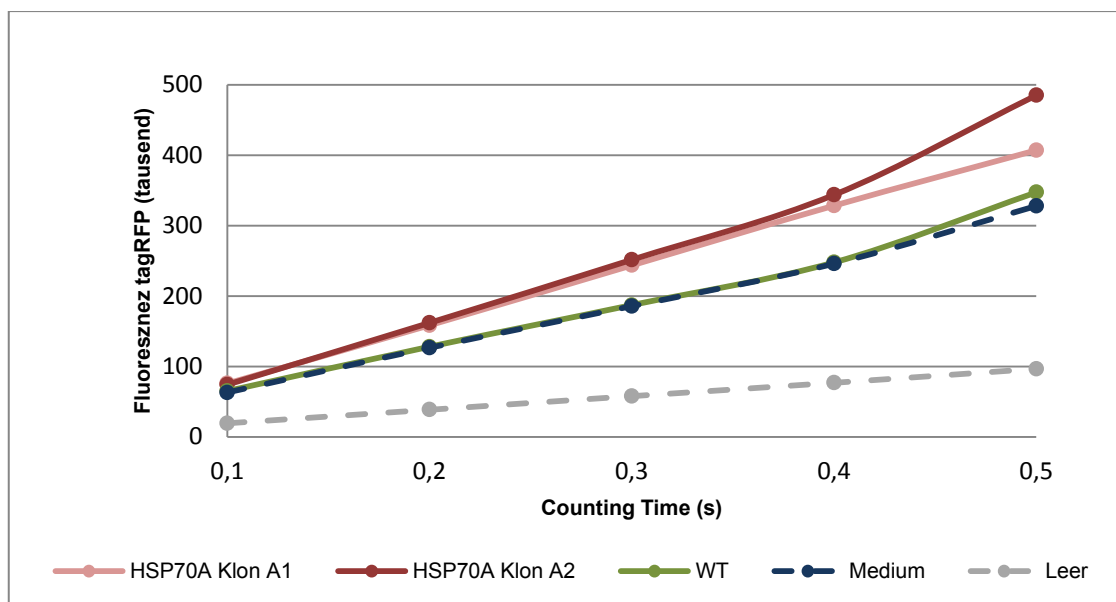


Diagramm 27: *Screening* Counting Time tagRFP

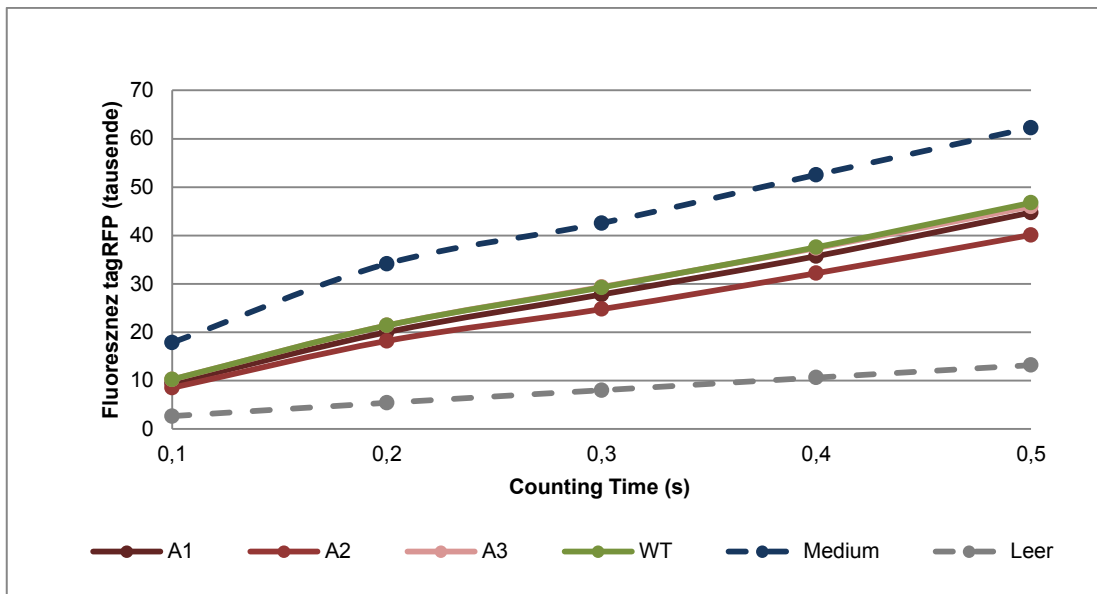


Diagramm 28: Screening Counting Time Reproduktion

In den Diagrammen 27 und 28 ist die gemessene tagRFP Fluoreszenz in Abhängigkeit unterschiedlicher Messzeiten dargestellt. Es wurden zum einen Klone, welche den HSP70A-RBCS2 Promotor enthalten, der Wildtypstamm, TAP-Medium und das leere well der Platten gemessen. Dabei fällt auf, dass eine Reproduktion der Messung nicht möglich ist und das Medium ein starkes Hintergrundsignal aufweist.

Im nächsten Schritt sollte bei gleichbleibender Messzeit von 0,5 s der Einfluss der Lichtintensität geprüft werden. Diese ist am Plattenlesegerät mit Werten von 0 bis 65535 einstellbar und entspricht 0-75 Watt in digitalen Schritten. Die Messung wurde auch hierbei mit denselben Klonen mehrmals wiederholt und die Messung erfolgte mit den angegebenen Filtern für tagRFP Anregung 540 nm und Emission 580 nm (siehe auch Geräte unter 5.1.10). Bei höheren Intensitäten war auch der Messwert erhöht, jedoch sollte immer eine möglichst geringe Stärke verwendet werden, um ein Ausbleichen der Algen zu verhindern. Bei genauerer Betrachtung des Bereichs der Lampenintensitäten zwischen 2500 und 3500 (digitale Schritte), dies entspricht in etwa 3-4 Watt, konnte derselbe Effekt wie beim *Screening* der Messzeit beobachtet werden. Die vorliegenden Klone wurden jeweils im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Klonen und kein Vorliegen von Fluoreszenz im Bereich von tagRFP beim WT festgestellt werden konnten. All dies deutet auf ein generelles Messproblem hin, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz idealer Filter nicht tagRFP gemessen wurde sondern nur Hintergrundsignal. Das *Screening* der Lampenintensität bei gleichbleibender Messzeit von 0,5 s ist in den folgenden Diagrammen 29 und 30 dargestellt.

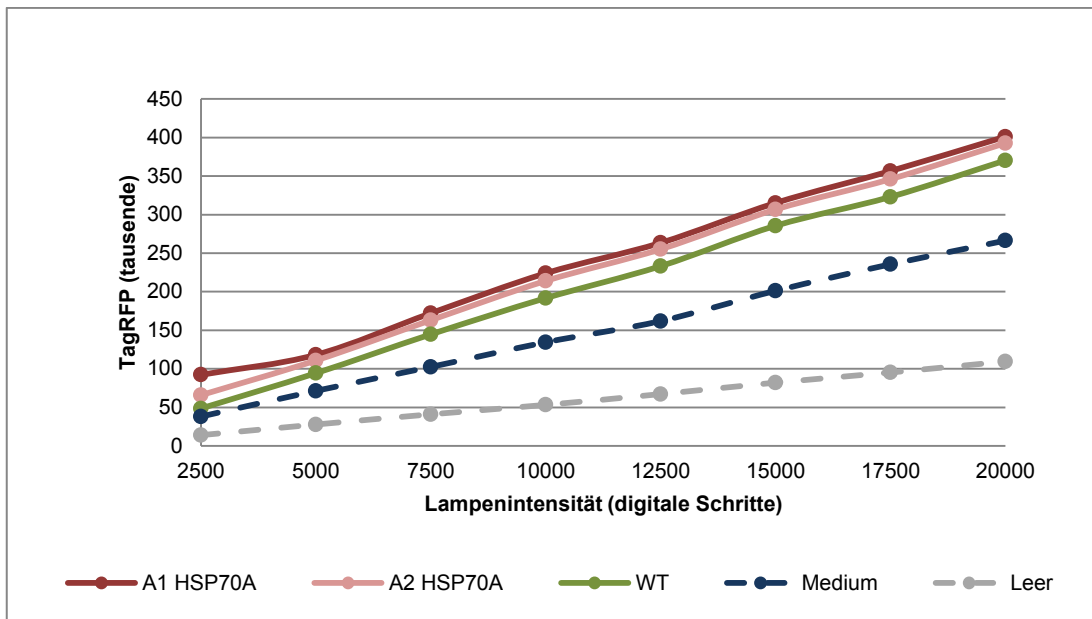


Diagramm 29: Screening Lampenintensität 2500-20000 (digitale Schritte) entsprechen 3-4Watt

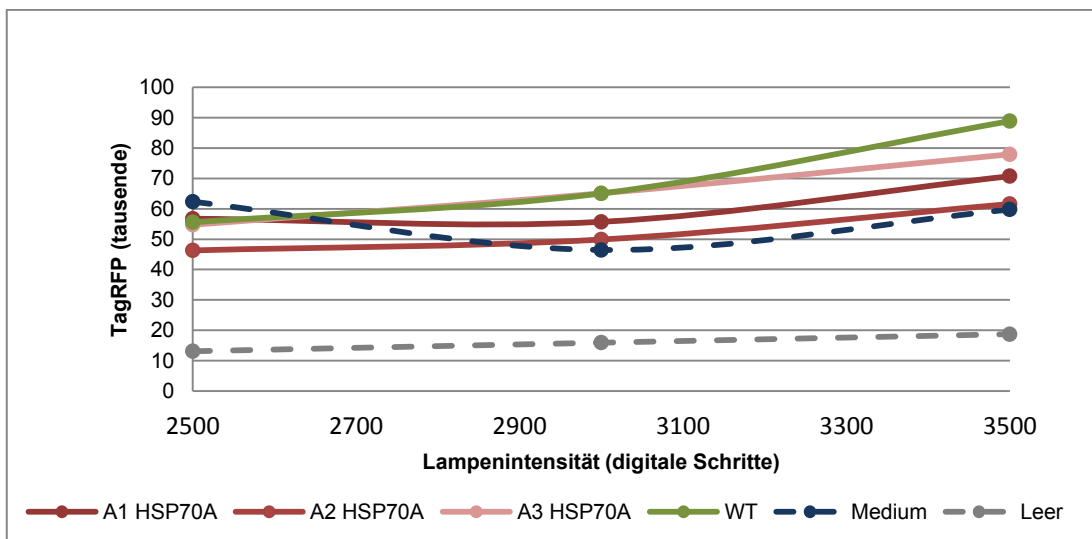


Diagramm 30: Screening Lampenintensität 2500 bis 3500 (digitale Schritte) entsprechen 3-4Watt

Die Diagramme 29 und 30 zeigen das Screening der Lampenintensität mit drei Klonen (A1-A3), welche den Promotor HSP70A-RBCS2 enthalten, den Wildtypstamm, TAP-Medium und das leere well.

Aufgrund der vorliegenden Screenings wurden, wenn auch nicht reproduzierbar, die Lampenintensität mit 3000, das entspricht etwa 3,4 Watt, und die Counting Time mit 0,5 s festgelegt. Mit diesen Parametern erfolgten die ersten Messungen.

3.8.4 Plattenlesermessungen tagRFP - Hitzeschock

Nach dem Hitzeschock bei 40°C für 30 min sollte die daraus resultierende gesteigerte Expression des Transgens tagRFP im Plattenlesegerät gemessen werden. Für die Messung wurden erneut Triplets der einzelnen Klonen herangezogen und es wurde bei einer Lampenintensität von 3000 (ca. 3,4 Watt) und einer Detektionszeit von 0,5 s die Fluoreszenz von tagRFP mit den entsprechenden Filtern gemessen. Die Fluoreszenz der vorliegenden Klonproben wurde parallel mittels Mikroskop aufgenommen und anhand der Software ImageJ ausgewertet. In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse der Plattenlesermessungen dargestellt. Dabei ist zum Zeitpunkt null die Messung vor dem Hitzeschock angeführt.

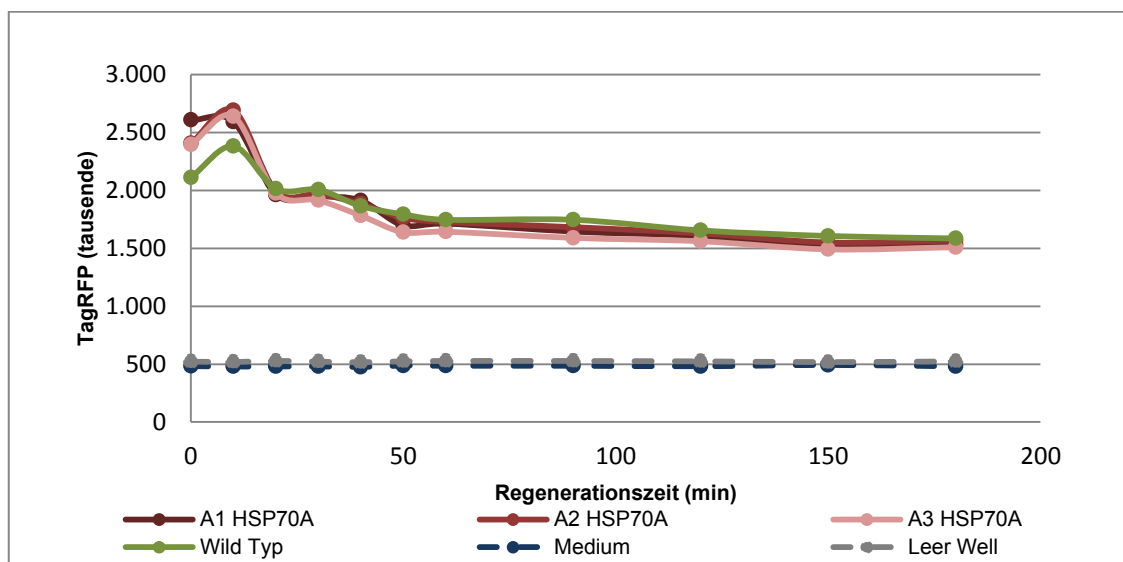


Diagramm 31: Hitzeschock 40°C für 30 min

Im Diagramm 31 ist die tagRFP Fluoreszenzmessung im Plattenlesegerät nach dem HS bei 40°C für 30 min gezeigt. Dabei sind jeweils Triplets der Klone A1-A3, welche die HSP70A-RBCS2 Promotorkombination und tagRFP enthalten gezeigt. Als Negativkontrollen dienten TAP Medium, der Wildtypstamm und das leere Well.

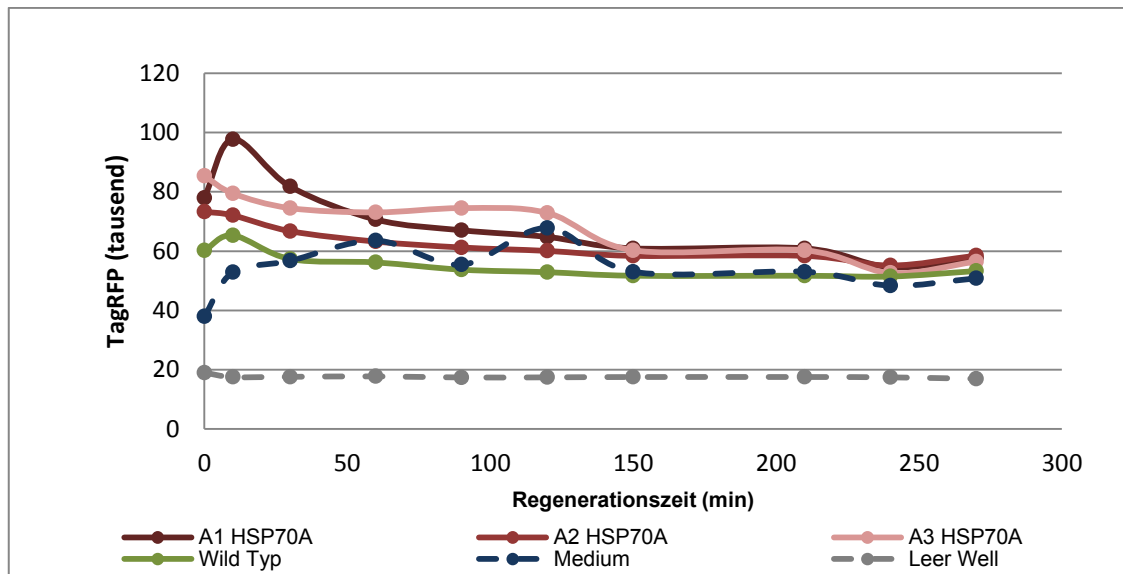


Diagramm 32. Hitzeschock 40°C für 30 min Reproduktion

Das Diagramm 32 zeigt Reproduktion der tagRFP Fluoreszenzmessungen im Plattenlesegerät nach dem HS bei 40°C für 30 mi. Dabei sind erneut jeweils Tripletts der Klone A1-A3, welche die HSP70A-RBCS2 Promotorkombination und tagRFP enthalten gezeigt. Als Negativkontrollen dienten TAP Medium, der Wildtypstamm und das leere Well.

Wie aus den Messungen ersichtlich wird, tritt der gleiche Effekt auf, der bereits beim Screening beobachtet werden konnte. Das Medium variierte erneut stark und der Wildtyp lag im selben Messbereich wie die Klone mit tagRFP. Dadurch konnte keine reproduzierbare oder aussagekräftige Messung etabliert werden. Es war hierbei nicht möglich das Hintergrundsignal von jenem, welches tatsächlich die tagRFP Fluoreszenz beschreibt zu unterscheiden.

3.8.5 ImageJ Auswertungen tagRFP Hitzeschock

Der Hitzeschock wurde im zweiten Schritt mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops und anschließender Auswertung mit der Software ImageJ wie im Methodenteil unter 5.2.26 beschrieben dokumentiert. Dazu wurden am Mikroskop für alle Messungen dieselben Einstellungen herangezogen. Die erste Hitzeschockmessreihe erfolgte mit 60facher und die zweite mit 100facher Vergrößerung. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden parallel und mit denselben Kulturen wie die Auswertung anhand des Plattenlesers angefertigt.

In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse der ImageJ Auswertungen gezeigt.

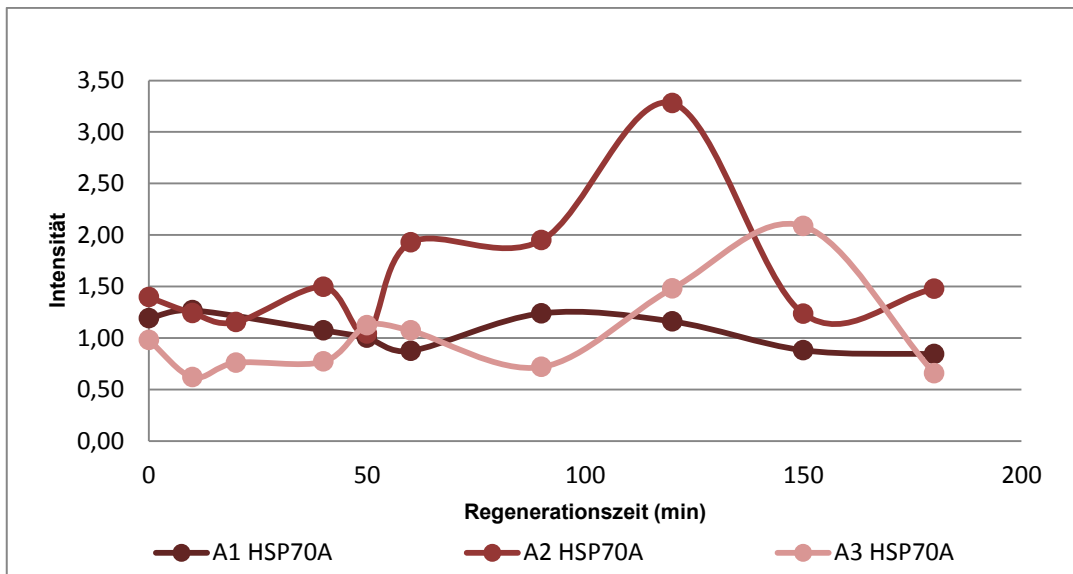


Diagramm 33: Intensität tagRFP/Chlorophyll Hitzeschock1 40°C für 30 min

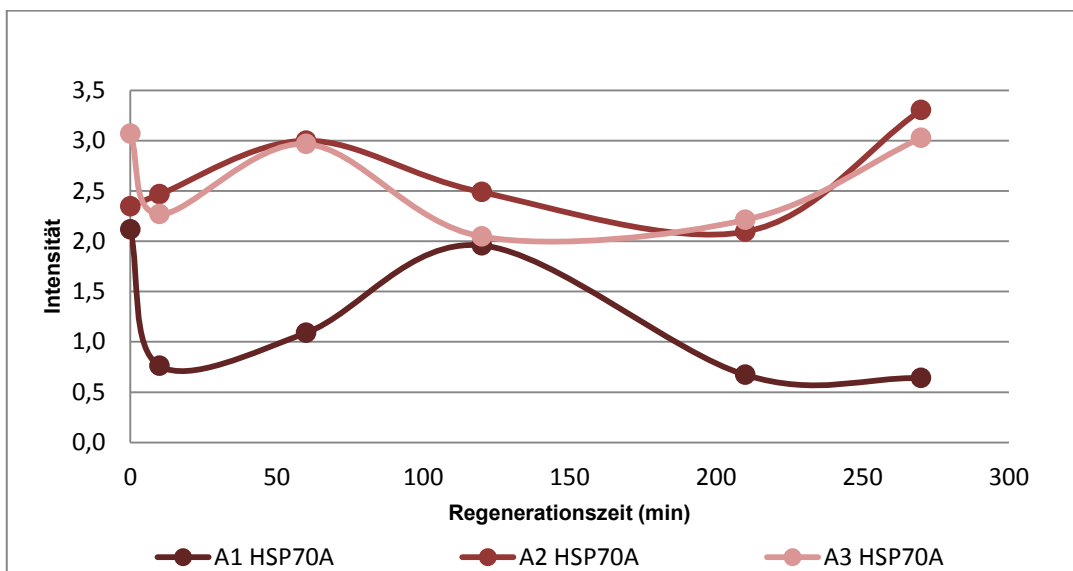


Diagramm 34: Intensität tagRFP/Chlorophyll Hitzeschock2 40°C für 30 min

Diagramm 33 und 34 zeigen die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels ImageJ Software der Klone A1-A3, welche den Promotor HSP70A-RBCS2 und tagRFP als Reporter enthalten.

Aus den Diagrammen 33 und 34, in welchen die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder mittels Image J von drei unterschiedlichen Klonen gezeigt ist, wird ersichtlich, dass die Methode durch die eigenständige Auswahl der Flächen im PC-Programm sehr starken Schwankungen unterliegt. Das Diagramm 37 zeigt dabei die Reproduktion der Messung aus Diagramm 36. Diese beiden Messungen unter exakt gleichen Bedingungen führten zu keinen übereinstimmenden Ergebnissen. Deshalb kann keine exakte Aussage über die Expressionsraten der Klone nach dem HS getroffen werden.

3.8.6 FACS Analysen

Um Einzelzellen untersuchen zu können, wurden zwei Klone mit tagRFP unter Kontrolle des Promotors *HSP70A-RBCS2* mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Messung erfolgte am Centrum für Chemie und Biomedizin der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck am Gerät LSRFortessa™ der Firma BD mit zugehöriger Software FACSDiva 6.2. Die verwendeten Einstellungen für tagRFP waren Anregungslaser 488 nm (blau) und Emissionsfilter und 610/20 nm (PE Texas red). Für die Chlorophyll Autofluoreszenz wurde derselbe blaue Anregungslaser 488 nm und der Emissionsfilter 530/30 (Alexa Fluor) verwendet. Der Anregungslaser war für tagRFP nicht ideal geeignet, da das Anregungsmaximum von tagRFP nur im unteren Bereich mit dem Laser übereinstimmt. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der FACS Analyse.

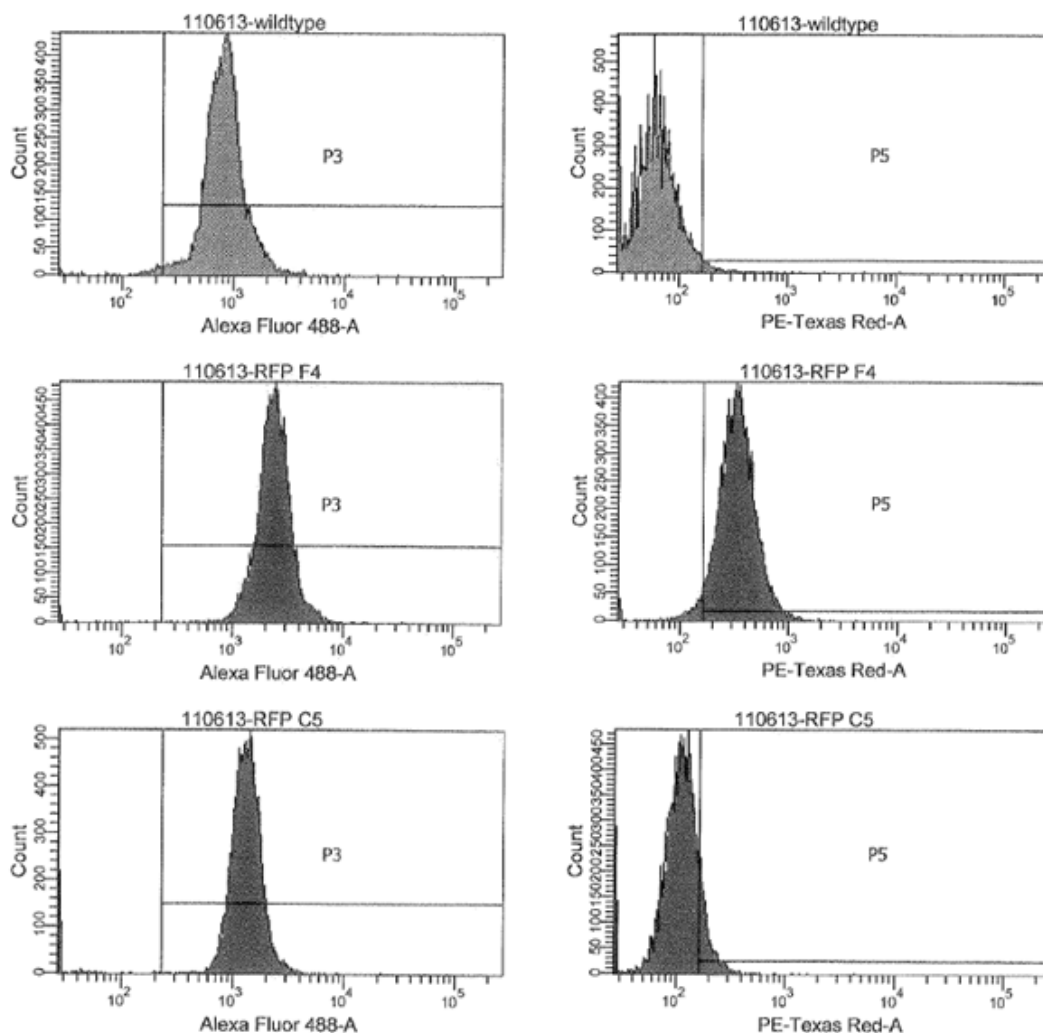


Abbildung 12: FACS Histogramm tagRFP Klone

In Abbildung 12 ist das Ergebnis der FACS Analyse mit den beiden RFP Klonen C5 und F4 gezeigt. Rechts ist hierbei die Chlorophyll Autofluoreszenz (Counts höher als die Grenze P3) und in der zweiten Spalte die auf Wildtyp genormte Messung (Grenze P5) von tagRFP gezeigt.

Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis der Histogramme in Werten.

Tabelle 18: Ergebnisse FACS tagRFP Klone

Probe	Grüne Fluoreszenz [%]	Alexa Fluor Mittelwert	Rote Fluoreszenz [%]	PE-Texas Red Mittelwert
WT	98,4	907	2,5	337
F4	99,5	2,475	95,6	365
C5	97,1	1,371	11,2	216

Die Bezeichnung C5 und F4 bezieht sich auf zwei unterschiedliche tagRFP Klone, welche den Promotor *HSP70A-RBCS2* enthalten und einmal mit 10 µg/ml Zeocin (Klon F4) und einmal mit 5 µg/ml (Klon C5) kultiviert wurden. Wie aus der Abbildung 12 ersichtlich wird ist die Autofluoreszenz wie zu erwarten bei den beiden Klonen und dem Wildtyp vergleichbar stark.

Um den Signalhintergrund zu minimieren wurde eine Grenze, welche in der Abbildung 12 als P5 bezeichnet ist, festgelegt und somit ergab sich eine rote Fluoreszenz von 95,6% für den Klon F4 und 11,2% für C5.

Um die vorliegenden FACS Daten zu bestätigen, wurde im nächsten Schritt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der beiden Klone angefertigt. Diese sind in Abbildung 13 gezeigt.

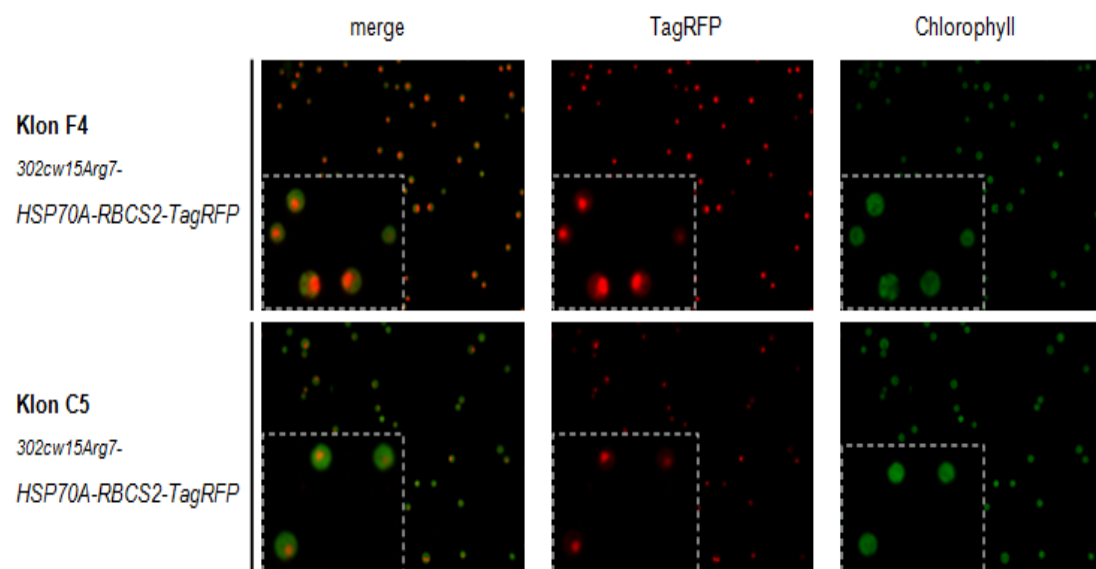


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopisches Vergleichsbild zum FACS tagRFP (Kothgassner 2013)

Abbildung 13 zeigt den Vergleich der im FACS analysierten Klone F4 und C5, welche den Promotor *HSP70A-RBCS2* und den Reporter tagRFP enthalten.

Auch bei den mikroskopischen Aufnahmen konnte eine stärkere tagRFP Fluoreszenz beim Klon F4 im Gegensatz zu C5 festgestellt werden. Trotz des nicht idealen Anregungslasers konnte somit die vorliegende durchflusszytometrische Messung bestätigt werden.

3.8.7 FACS Analysen und Sortierung

Die Analyse mittels FACS mit nachfolgendem *Cell Sorting* erfolgte am Institut für Ökologie der Leopold Franzens Universität Innsbruck bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ruben Sommaruga. Dabei wurde der *Cell Sorter* MoFlo Astrios des Herstellers Beckman verwendet. Die benötigten Einbauten waren für Chlorophyll-Messungen ein blauer Laser mit 488 nm und der Filter 680/20 nm. Der grün gelbe Laser mit 561 nm und der Filter 610/20 nm wurden für tagRFP verwendet. Klone, welche den HSE8x-RBCS2- und HSP70A-RBCS2 Promotor und den Reporter tagRFP enthielten, wurden auf ihre Chlorophyll Autofluoreszenz und die Fluoreszenz des Reporters tagRFP hin analysiert. Als Negativkontrolle diente der cc4350 WT-Algenstamm. Dabei konnten wie in den folgenden Abbildungen 14-16 ersichtlich zwei Gruppen an tagRFP Fluoreszenz beobachtet und anschließend sortiert werden.

Bei diesen Gruppen handelte es sich laut fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und Vergleich mit WT Stamm um Zellen, welche starke und einheitliche tagRFP Fluoreszenz (high) und Zellen, welche schwache, teils nicht vorhandene Fluoreszenz aufwiesen (low). Ziel war es, diese Gruppen zu sortieren und anschließend über einen Zeitraum von einem Monat unter Selektionsdruck weiter zu kultivieren, um den Einfluss von Silencing auf die beobachteten unterschiedlich stark fluoreszierenden Zellgruppen feststellen zu können. Aufgrund von hohen Salzkonzentrationen, durch welche die *Chlamydomonas* Zellen Großteils abgestorben sind und Kontaminationen während der auf das Sorting folgenden Kultivierung konnte allerdings keine weitere Aussage über die Genstilllegung getroffen werden, da die Algenzellen trotz Antibiotikamix nicht anwachsen konnten und von Kontaminanten überwuchert wurden.

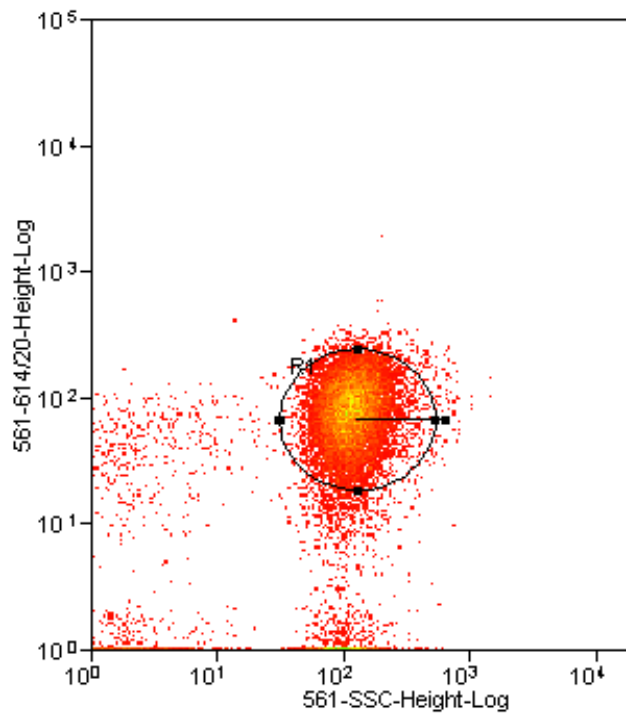


Abbildung 14: WT Stamm-Negativkontrolle Hintergrundsignal tagRFP Fluoreszenz

Abbildung 14 zeigt die FACS Analyse des Wildtypstamms cc4350 mit dem 561 nm Laser (561-SSC) und dem Filter 614/20 nm. Aufgetragen ist zum einen die Größe der Zellen (SSC) auf der x-Achse und die Anzahl auf der y-Achse. Der WT Stamm dient als Negativkontrolle, um den Bereich (R1) welcher dem Hintergrundsignal entspricht definieren zu können.

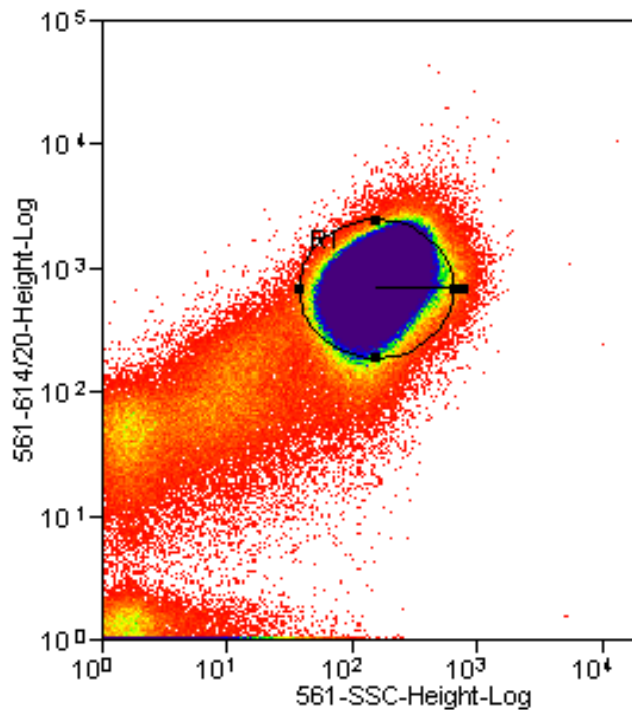


Abbildung 15: tagRFP Fluoreszenz FACS_Promotor HSE8x_RBCS2

Abbildung 15 zeigt die FACS Analyse eines Klons mit dem HSE8x-RBCS2 Promotor und tagRFP - mit dem 561 nm Laser und dem Filter 614/20 nm. R1 bezeichnet dabei den Bereich mit starker tagRFP Fluoreszenz.

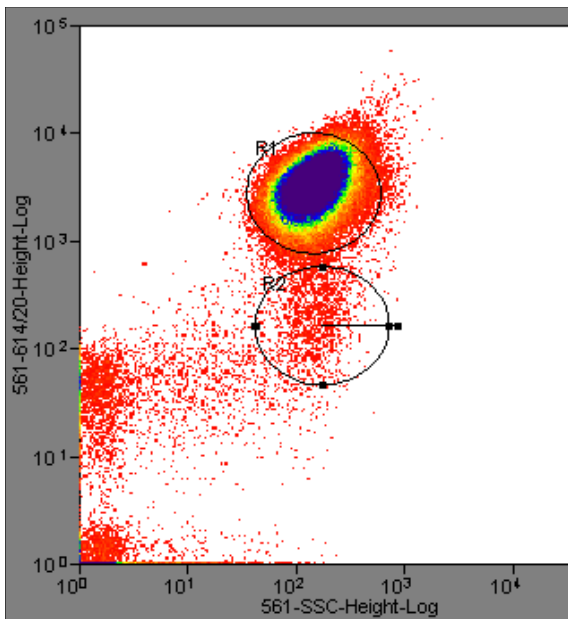


Abbildung 16: tagRFP Fluoreszenz FACS_Promotor HSP70A_RBCS2

Abbildung 16 zeigt die FACS Analyse eines Klons mit dem HSP70A-RBCS2 Promotor und tagRFP - mit dem 561 nm Laser und dem Filter 614/20 nm. R1 und R2 bezeichnen dabei die Bereiche high – mit hoher tagRFP Fluoreszenz (R1) und low mit schwacher bis nicht vorhandener Fluoreszenz (R2). Der Bereich R2 liegt von der Größe der Zellen (SSC) im Bereich des Hintergrunds (vgl. Abb. 14).

Es konnte mithilfe des cc4350 WT-Stamms als Negativkontrolle, jener Bereich, welcher dem Hintergrundsignal an tagRFP Fluoreszenz entspricht, ermittelt werden. Die beiden Klone mit den Promotorkonstrukten *HSP70A-RBCS2* und *HSE8x-RBCS2* wiesen wie zu erwarten unterschiedliche Gruppen (R1, R2) auf. Dabei waren Zellgruppen, welche weniger stark bis gar nicht fluoreszierten (low-R2) und Zellen mit hoher tagRFP Fluoreszenz (high-R1). Dies konnte auch mit der parallel durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die beiden Gruppen wurden mithilfe des Cell Sorters in zwei unterschiedliche Kultivierungsgefäße, welche TAP-Medium enthielten, sortiert.

3.8.8 Klonierung tagRFP für die Chloroplasten-Expression

Um den Vorteil von tagRFP, das nicht mit der Chlorophyllautofluoreszenz interagiert, weiter zu nutzen, wurde ein Konstrukt für die Expression im Chloroplasten generiert. Dazu wurde das Plasmid p463 von Goldschmidt-Clermont mit dem synthetischen codon optimierten Gen für cptagRFP aus dem Plasmid cp_RFP-pMK der Firma Eurofins Genomics ligiert (Goldschmidt-Clermont, 1991). Daraus entstand das Plasmid pMCI92. Mithilfe der Primer P463 5-3 *SacI* reverse und p463 5-3 *NotI* forward wurde das Fragment mit dem Antibiotikaresistenzgen *aadA* aus p463 amplifiziert und mit dem Vektor p463 ligiert. Daraus entstand das Plasmid pMCI93, welches anschließend linearisiert und mithilfe einer Genkanone ins Chloroplastengenom von *C. reinhardtii* eingebracht wurde (Dreesen et al., 2010; Hahnewald, 2013). Dabei konnte zwar wie in Abbildung 17 gezeigt ein Fluoreszenzsignal im Bereich von tagRFP im Mikroskop festgestellt werden, allerdings trat dieses bei der vorliegenden Aufnahme ausschließlich in toten Zellen und nicht wie zu erwarten im Chloroplasten der Zelle auf. Dadurch konnte zum einen geklärt werden, dass die Expression von tagRFP im Chloroplasten der Alge nicht stattgefunden hat. Dies könnte an nicht erfolgter Integration ins Genom aber auch an fehlender Homoplasmie der Zellen liegen. Viel wichtiger war jedoch hierbei die Erkenntnis, dass bei abgestorbenen Zellen störende Fluoreszenzhintergrundsignale auftreten können, welche die zuvor im Ergebnisteil unter 3.8.4 gezeigten Messungen des im Kerngenom exprimierten tagRFP ganz maßgeblich negativ beeinflussen können.

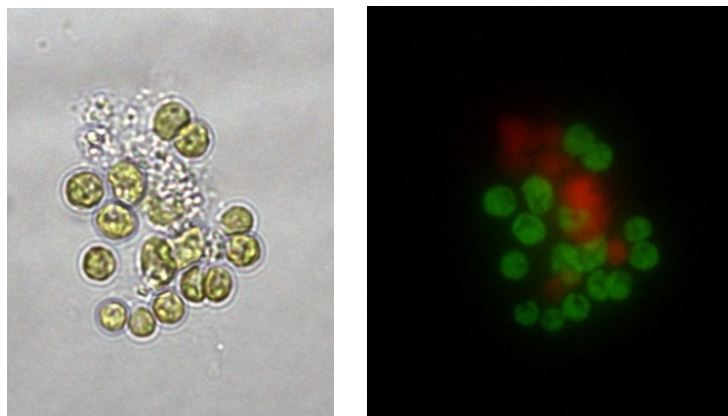


Abbildung 17: Fluoreszenz von toten Zellen im Spektralbereich tagRFP

Abbildung 17 zeigt die Überlagerung der Autofluoreszenzaufnahme mit jener von tagRFP in abgestorbenen Zellen. Dabei wird ersichtlich, dass es in toten Zellen zu einem Hintergrundsignal kommt.

3.9 mCherry als Reporter in *C. reinhardtii*

Um mCherry mit tagRFP vergleichen zu können wurde zum einen das Plasmid pBR9mCherry bei Beth Rasala vom Labor Stephen Mayfield angefordert. Das codonoptimierte mCherry-*ble* Fusionskonstrukt mit 2A Schnittstelle aus dem Maul- und Klauenseuche Virus wurde parallel dazu bei MWG Eurofins synthetisiert. Das synthetische Gen wurde mittels *XhoI/BamHI* aus dem Standardsynthesevektor geschnitten und in das Plasmid pMCI76 ligiert. Daraus entstand das Plasmid pMCI108, welches mCherry, die 2A Schnittstelle und *ble* enthält. Das mCherry Fluoreszenzprotein sollte durch die Trennung von der *ble* Resistenz im Cytoplasma zu finden sein.

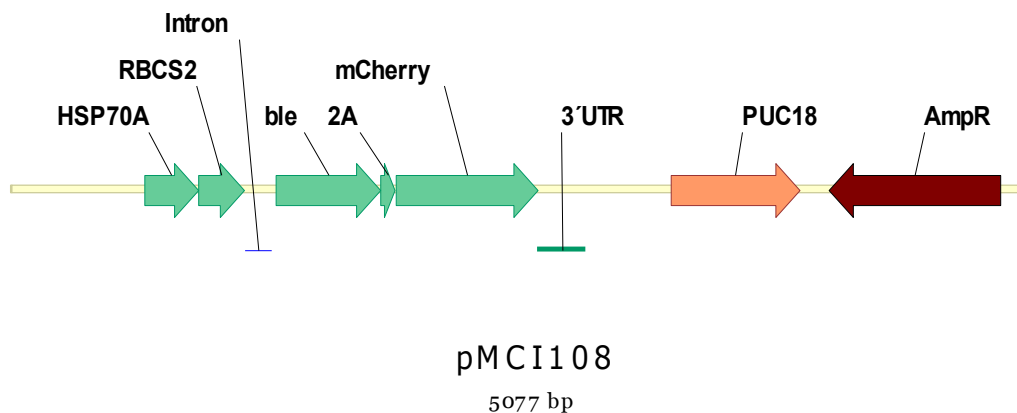


Abbildung 18: *ble*2A mCherry Plasmid

In Abbildung 18 ist das Plasmid pMCI108 gezeigt. Es enthält den HSP70A-RBCS2 Promotor, das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, den Origin of Replication (PUC18) für die Klonierung in *E. coli*, den Fluoreszenzreporter mCherry als Fusionsplasmid mit der Zeocinresistenz (*ble*) und zur Trennung des Fusionsproteins ist zudem die 2A-Schnittstelle aus dem Maul- und Klauenseuche Virus enthalten.

Außerdem wurde pMCI109 kloniert. Dabei wurde das Plasmid pMCI76 mit dem aus dem synthetischen Vektor geschnittenen mCherry fusioniert. Somit fällt die 2A Schnittstelle weg und mCherry sollte im Kern lokalisiert sein, da es als Fusionsplasmid mit *ble* vorliegt.

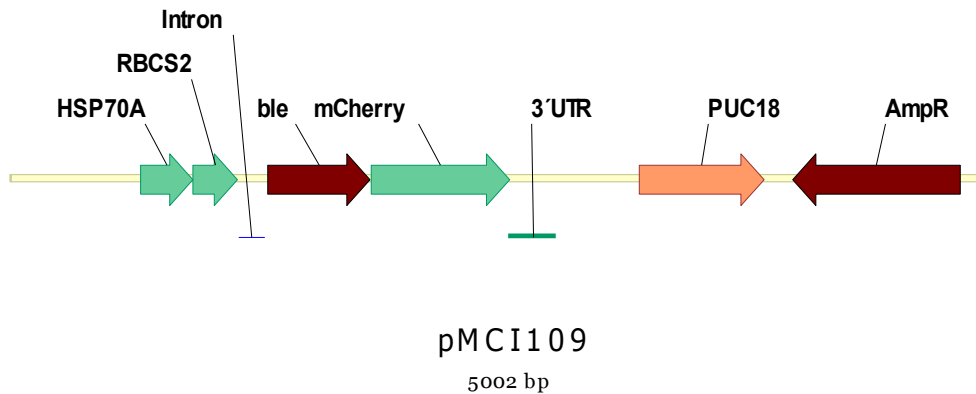


Abbildung 19: *ble*mCherry Plasmid

In Abbildung 19 ist das Plasmid pMCI109 gezeigt. Es enthält den HSP70A-RBCS2 Promotor, das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, den Origin of Replication (PUC18) für die Klonierung in *E. coli* und den Fluoreszenzreporter mCherry als Fusionsplasmid mit der Zeocinresistenz (*ble*).

Weiterhin sollte noch das Plasmid pMCI110 generiert werden. Es enthält die 2A Schnittstelle zwischen tagRFP und *ble* und somit sollte tagRFP ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert sein.

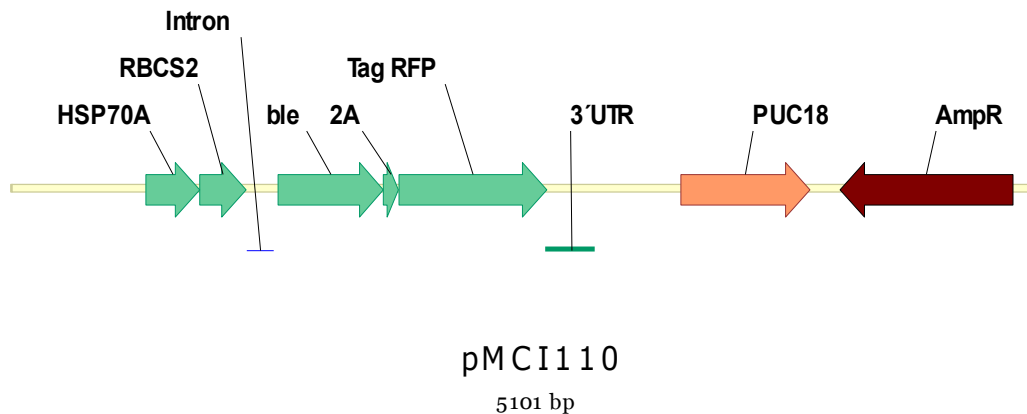


Abbildung 20: *ble*2AtagRFP Plasmid

In Abbildung 20 ist das Plasmid pMCI110 gezeigt. Es enthält den HSP70A-RBCS2 Promotor, das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, den Origin of Replication (PUC18) für die Klonierung in *E. coli*, den Fluoreszenzreporter tagRFP als Fusionsplasmid mit der Zeocinresistenz (*ble*) und zur Trennung des Fusionsproteins ist zudem die 2A-Schnittstelle aus dem Maul- und Klauenseuche Virus enthalten.

In folgender Tabelle sind nochmals die Plasmide, welche tagRFP und mCherry enthalten zusammengefasst.

Tabelle 19: Klonierung mCherry

Plasmidderivat Name	Ursprungsplasmid	Promotor	Eigenschaften
pMCI108	pMCI76/pexK4mCherry (Eurofins Genomics)	<i>HSP70A-RBCS2</i>	<i>ble2A</i> -mCherry
pMCI109	pMCI76/pexK4mCherry (Eurofins Genomics)	<i>HSP70A-RBCS2</i>	<i>ble</i> -mCherry
pMCI110	pMCI76/pexK4mCherry (Eurofins Genomics)	<i>HSP70A-RBCS2</i>	<i>ble2A</i> -tagRFP

Diese Plasmide wurden in *C. reinhardtii* transformiert. Anschließend sollten im Fluoreszenzmikroskop der Lokalisationsort und die Helligkeit der Fluoreszenzproteine analysiert werden. Dabei konnte, wie aus den folgenden Abbildungen 21 und 22 ersichtlich wird, die Lokalisation der Fluoreszenzproteine bestätigt werden. Allerdings konnte keine Aussage über deren Helligkeit getroffen werden.

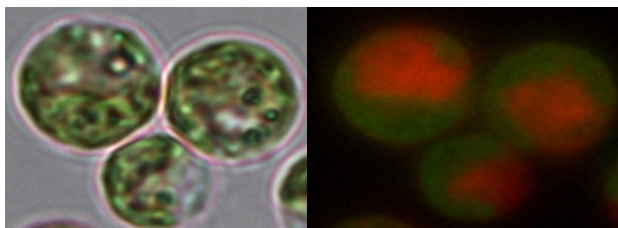


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahme *ble2AmCherry*_pMCI108

Abbildung 21 zeigt links die licht- und rechts die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines *C. reinhardtii* Klons mit dem Plasmid pMCI108 (*ble2AmCherry*). Daraus wird die Lokalisation des mCherry Reporters (in rot gezeigt) im Cytoplasma ersichtlich. Außerdem ist in grün die Autofluoreszenz des Chlorophylls dargestellt.

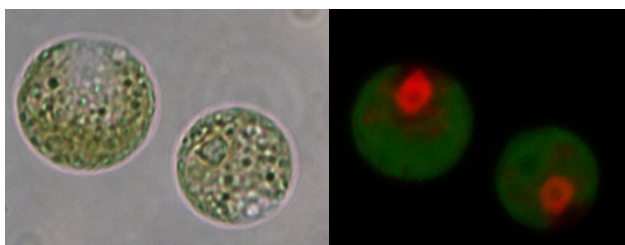


Abbildung 22: Mikroskopische Aufnahme *blemCherry*_pMCI109

Abbildung 22 zeigt links die licht- und rechts die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines *C. reinhardtii* Klons mit dem Plasmid pMCI109 (*blemCherry*). Daraus wird die Lokalisation des mCherry Reporters (in rot gezeigt) im Kern ersichtlich. Außerdem ist in grün die Autofluoreszenz des Chlorophylls dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Messung der Expressionsraten mittels Luciferase Assay

Die Luciferasestandardgerade wurde wie im Ergebnisteil unter 3.1 beschrieben mit aufgereinigter, rekombinanter *Renilla* Luciferase erstellt. Diese sollte dem Abschätzen der zu verwendeten Bedingungen beim Messen am Plattenlesegerät dienen und gleichzeitig die Menge an produziertem Luciferase Enzym in den Algen darstellen. Die Luciferaseausbeute in den transgenen *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen konnte zwar im Vergleich mit anderen Promotoren um das drei- bis fünffache erhöht werden, wobei die Menge allerdings noch immer sehr gering war. Es wurde ein direkter Vergleich der aufgereinigten Luciferase mit jener aus *C. reinhardtii* durchgeführt. Bei *Chlamydomonas reinhardtii* spielen jedoch zusätzlich Positionseffekte im Genom eine wesentliche Rolle (Kindle et al., 1994). Allerdings konnten beim Standardmessprotokoll mit 5 μ M Coelenterazin und der Messung in TAP die RLU-Werte ab 10000 einer Enzymkonzentration zugewiesen werden (vgl. Diagramme 4 und 5).

Die hohen Standardabweichungen während der Luciferase-Expressionsmessungen mit den einzelnen Promotorkonstrukten am Plattenlesegerät sind wahrscheinlich auf die starken Unterschiede der einzelnen Klone je Promotorkonstrukt zurückzuführen. Auch wenn die negativen Werte weggelassen werden, kommt es durch Positionseffekte zu starken Abweichungen zwischen den einzelnen Klonen. Diese konnten durch die drei voneinander unabhängigen Wiederholungen der Transformationen und Messungen und durch die hohe Klonanzahl pro Promotorkonstrukt minimiert werden. *Renilla reniformis* Luciferase ist bis zu einer Temperatur von 45°C bei Inkubation bis zu 1 h stabil (Matthews et al., 1977; Shao et al., 2008). Allerdings könnten die teils starken Schwankungen vor allem bei den Hitzeschockmessungen auf die Neigung des Enzyms zu Selbstassoziation zurückzuführen sein. Dies geschieht vor allem aufgrund der hohen Hydrophobizität des Proteins und das Vorhandensein von großteils aromatischen und hydrophoben Aminosäureresten (Matthews et al., 1977).

Zusätzlich wurde der Luciferase Assay nicht unter optimalen Puffer Bedingungen, wie er im Test- oder auch Enzympuffer, welche im Methodenteil beschrieben wurden, auftritt, durchgeführt, sondern in TAP-Medium.

Dies könnte aufgrund der enthaltenen Spurenelemente einen zwar geringen aber doch erwähnenswerten Einfluss auf die Messung haben (Matthews et al., 1977).

4.2 Verbesserte Transgenexpression in *C. reinhardtii* durch synthetische Hitzeschockelemente

Die HSE Consensussequenz für Eukaryonten weist allgemein folgende Nukleotidabfolge auf: 5'nGAAn3'. Dabei ist wie bereits erwähnt eine Anordnung drei solcher Elemente nötig, um eine gute Bindung des HSF zu ermöglichen. Dies resultiert in folgender Sequenz: 5'GAAnnTTCnnGAAn3'. In Pflanzen konnte 5'aGAAG3' als optimaler HSE Core Consensus festgestellt werden (Barros et al., 1992; Schöffl et al., 1998). Die synthetischen HSEs weisen folgende Grundsequenz auf, welche in bis zu acht Wiederholungen auftritt: 5'GTTCTAGAACGTTCT3'. Die Aneinanderreihung erfolgt dabei wie folgt mit einem Abstand von vier Nukleotiden zwischen den einzelnen Elementen: 5'GTTCTAGAACGTTCTCGACGTTCTAGAACGTTCT3' (Cunniff et al., 1993; Czerny et al., 2005). Vergleicht man diese mit den HSEs wie sie im *Chlamydomonas reinhardtii* Promotor *HSP70A* vorkommen und in folgender Tabelle 20 gezeigt sind, fällt auf, dass diese Sequenzen stark vom Consensus abweichen und der Abstand zwischen den Elementen nicht immer gleich groß ist.

Tabelle 20: Hitzeschockelemente im Promotor HSP70A von *C. reinhardtii* (Lodha et al., 2005)

HSE Nummer	Sequenz
HSE0	GAACCTTCGCGCACCTC
HSE1	GTCCAGAAGGCGCCATAC
HSE2	GGAAGCTCTGAAGGGCCGCGAT
HSE3	GAAGCTACAGGAC
HSE4	GAAGGGCCGCGACGGTTCGAGAACCACTTGAG

Warum funktionieren also die soeben beschriebenen synthetischen HSEs in *Chlamydomonas reinhardtii*? HSF1 ist der Hauptregulator in nahezu allen Eukaryonten so auch in *C. reinhardtii*. Dieser HSF hat in allen Organismen konservierte Bereiche.

Dazu gehören die DNA-Bindedomäne, hydrophobe, sich wiederholende Domänen und regulatorische Domänen (Shamovsky et al., 2008). Die HSF1-Aktivierung ist in *Chlamydomonas* ähnlich zu anderen Eukaryonten, vor allem höheren Pflanzen, allerdings ist eine Umwandlung von einer monomeren in eine trimere Struktur hierbei nicht nötig, da HSF1 in *Chlamydomonas* konstitutiv als Trimer vorliegt. Dieses Trimer hat eine hohe Affinität zu sogenannten Hitze-Schock-Elementen (HSEs), welche in nahezu allen hitzeinduzierbaren Promotoren vorkommen. Hitzeschockelemente weisen in Eukaryonten zumeist die Grundstruktur 5'nGAAn3' auf und kommen in wiederholter Form vor. In *C. reinhardtii* sind die Hitzeschockelemente HSE0-4 aus dem Hitze-Schock-Promotor *HSP70A* untersucht. Diese *Chlamydomonas* eigenen HSEs weichen stark von der Grundsequenz, wie sie in anderen Organismen beschrieben wurde, ab. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass synthetische HSEs, welche auf die DNA-Sequenz eukaryontischer Systeme optimiert wurden, als Einzelelement oder in sich wiederholender Form in *C. reinhardtii* zu erhöhter basaler bzw. induzierter Expression des Transgens führen. Die Untersuchungen in anderen Eukaryonten, unter anderem in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und auch in *Drosophila melanogaster* ergaben, dass für die Bindung von HSF mindestens drei Wiederholungen vorhanden sein müssen. Dies resultiert in der Consensussequenz 5'GAAnnTTCnnGAAn3', wie sie auch in abgewandelter Form im synthetischen Hitzeschockelement in einfacher Wiederholung (HSE1x) vorkommt (5'GTTCTAGAACGTTCT3'). Bei drei Wiederholungen werden die besten Bindungsbedingungen des HSF Trimer geboten (Schöffl et al., 1998). Die Stärke des *HSP70A*-Promotors, vor allem in Kombination mit *RBCS2* aus *C. reinhardtii*, kann sowohl konstitutiv als auch durch Induktion mit beispielsweise Hitze nachgewiesen werden. Gründe hierfür liegen zum einen an den in *HSP70A* enthaltenen HSEs, welche die Bindung des HSF1 ermöglichen und zum anderen an der Chromatinstruktur, welche in *HSP70A* in aktiverer Form vorkommt wie dies beispielsweise in *RBCS2* der Fall ist. Diese offene Chromatinstruktur ist durch diverse Modifikationen wie Acetylierungen und Methylierungen an Histonen gekennzeichnet und spielt neben der RNA-Polymerase II Rekrutierung eine wesentliche Rolle in der eukaryontischen Genregulation.

Da diese aktiven Chromatinstrukturen in *C. reinhardtii* selten vorkommen und zudem der Einbau von Transgenen an zufälligen Stellen im Genom stattfindet, ist die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren bei anderen Promotoren nicht immer gegeben.

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die epigenetische Stilllegung von Transgenen durch den HSF1 verringert wird. Nicht alle HSEs des *HSP70A* sind dabei von gleicher Bedeutung. Eine wesentliche Rolle spielen HSE2 und 4 und die TATA Box (Lodha et al., 2005; Strenkert et al., 2011b). In der folgenden Abbildung 23 sind die Histonmodifikationen in *HSP70A* nach der Bindung des HSF an HSE und die daraus resultierende RNA-Polymerase Rekrutierung in *HSP70A* gezeigt (Strenkert et al., 2011b).

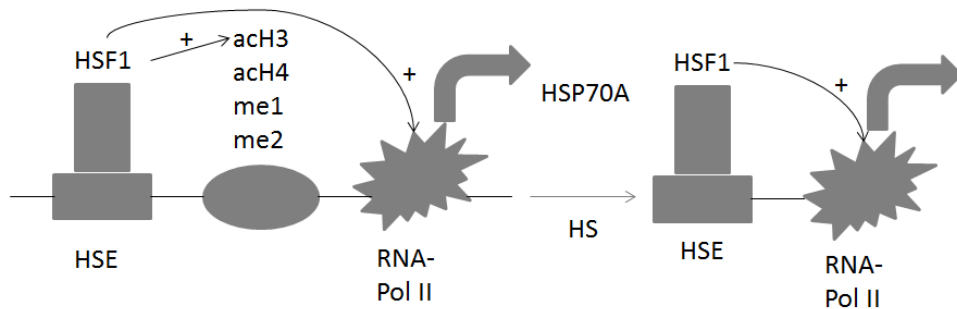


Abbildung 23: Chromatinstadien bei *HSP70A* unter Einfluss des HSF1 nach (Strenkert et al., 2011b)

In Abbildung 23 sind die Histonmodifikationen nach Bindung des HSF an HSE in *HSP70A* aus *C. reinhardtii*, und die daraus resultierende RNA-Polymerase II Rekrutierung, gezeigt (Strenkert et al., 2011b).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann man annehmen, dass die synthetischen HSEs in Kombination ähnliche Wirkung haben und zum einen die offene Chromatinstruktur und zum anderen die RNA-Polymerase-II Rekrutierung ideale Faktoren darstellen und dies auch im Fall der synthetischen HSEs durch Bindung des HSF1 auf *RBCS2* übertragbar ist. Es konnte nicht geklärt werden, weshalb HSE8x-*RBCS2*, wie aus den Diagrammen 19 bis 21 und dem Diagramm 26 ersichtlich wird, sich besser und reproduzierbarer durch Hitze induzieren lässt als die anderen HSE-Wiederholungen, obwohl die Abstände zwischen den Elementen dieselben sind und nur die Anzahl der Elemente variiert. HSE1x-*RBCS2* weist wie vor allem in den Diagrammen 7-9 ersichtlich wird die höchste Basalexpression auf.

4.2.1 Hitzeschock HSE8x-RBCS2 und anschließende Kultivierung

HSE8x-RBCS2 war als einzige der neuartigen Promotorkombination reproduzierbar durch Hitze induzierbar (siehe Diagramme 19-21 – 1h nach Hitzeschock). Die anderen Promotoren zeigten teils starke Schwankungen in der Expression. Bei HSE1x-RBCS2 konnte zwar ein Anstieg durch die Hitzeinduktion festgestellt werden, allerdings wurde dadurch nur der ohnehin hohe Basalexpressionslevel wieder erreicht. Deshalb wurde nach dem HS bei 40°C für 30 min wie im Ergebnisteil unter 3.5 beschrieben bei der Promotorkombination HSE8x-RBCS2 die Expression der *rluc* über einen Zeitraum von bis zu 6 h gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Lumineszenz zunächst abnahm, was auf das Absterben einzelner Zellen und somit auf eine Abnahme der Luciferase-Konzentration nach dem Hitzeschock hindeuten könnte. Anschließend konnte eine Steigerung der um das bis zu dreifache im Vergleich zu *HSP70A-RBCS2* gemessen werden, wie aus Diagramm 26 ersichtlich wird. Erst etwa 3,5-4 h nach dem HS tritt die höchste Expression des Reporters unter Kontrolle des Promotors HSE8x-RBCS2 auf (siehe dazu Diagramme 24 und 25).

Dies deckt sich mit den Expressionsstudien wie sie von Ortner und Kollegen 2015 mit den auch in dieser Arbeit verwendeten synthetischen HSEs in Zellkulturen durchgeführt wurden (Ortner et al., 2015). Hier wurde der Effekt auf die Expression bei hohen HS-Temperaturen auch verzögert festgestellt (Ortner et al., 2015).

4.2.2 HSE1x-6x-RBCS2-Verbesserte Basalexpression mit HSE1x-RBCS2

Bei den Messungen der synthetischen Hitzeschockelemente in unterschiedlichen Wiederholungen wie sie im Ergebnisteil unter 3.3 gezeigt sind konnte festgestellt werden, dass die Promotorkombination HSE1x-RBCS2 die größte Steigerung im Vergleich zur Positivkontrolle bei nicht induzierter Expression aufweist. Die Hitzeinduktion bei 40°C für 30 min hatte wie bereits beschrieben den größten Einfluss auf die Promotorkombination HSE8x-RBCS2 und führte zu einer Steigerung um das bis zu dreifache wie aus dem Diagramm 26 ersichtlich wird. Da bestätigt werden konnte, dass die Induktion über die standardisierte Hitzeschockantwort funktioniert (siehe ChIP Assay im Ergebnisteil unter 3.6) ist eine mögliche Ursache, dass HSE8x in Kombination mit RBCS2 die günstigste Bindungsstelle für den HSF1 bildet (Strenkert et al., 2013). Die Kombination HSE1x-RBCS2 erzielte wie bereits erwähnt die höchste Expression der Luciferase, wobei dabei bereits die Basalexpression sehr hoch war und nach der Induktion diese wieder auf das in etwa gleich hohe Expressionsniveau angestiegen ist.

Dies könnte daran liegen, dass HSE1x eine ideale Plattform für die RNA-Polymerase-II Rekrutierung darstellt, wie es von Strenkert und Kollegen 2013 beschrieben wurde (Strenkert et al., 2013).

Allerdings konnte somit nicht geklärt werden, weshalb die Standardexpressionen der anderen HSE Wiederholungen niedriger sind.

4.2.3 Unterschiedliche Hitzeschock-Bedingungen

Wenn der Hitzeschock in Säugerzellen, in welchen dieselben synthetischen HSEs verwendet wurden, bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeitdauer durchgeführt wird konnte festgestellt werden, dass niedrige Temperaturen und verlängerte Einwirkzeit schnell zu einer Erhöhung der Expression führen. Bei hohen Temperaturen erfolgt dieser Anstieg zeitverzögert. (Ortner et al., 2015) (Prof. Thomas Czerny persönliche Mitteilung). Dies konnte in *Chlamydomonas reinhardtii*, wie im Ergebnisteil unter 3.7 kurz beschrieben, ähnlich beobachtet werden. Bei einer Temperatur von 36°C erfolgte die HS Antwort innerhalb weniger Minuten. Bei 40°C war nach wie vor HSE8x-RBCS2 der stärkste Promotor nach Hitzeinduktion.

Die Promotorkombination HSE1x-RBCS2 sollte in Zusammenhang auf die Hitzeinduktion vernachlässigt werden, da die Basalexpression dieses Konstrukts bereits sehr hoch ist und der Hitzeschock lediglich einen Anstieg auf das schon sehr hohe Basalexpressionsniveau bewirkt. Aufgrund dessen dass es sich um den Mittelwert von drei ausgewählten Klonen mit der höchsten zuvor gemessenen Basalexpression handelt, können unter anderem Positionseffekte eine Rolle spielen. Dies wird an der vorliegenden Standardabweichung ersichtlich und kann auf die Integration an unterschiedlichen Stellen im Kerngenom zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der Hitzeschockexperimente bei unterschiedlichen Temperaturen wurden allerdings nur einmal durchgeführt und müssten, um eine exakte Aussage treffen zu können zunächst reproduziert werden. Der HS bei 40°C für 30 min wurde allerdings dreimal reproduziert (vgl Diagramme 19-21) und lieferte das bereits diskutierte Ergebnis, dass HSE8x-RBCS2 sich, wie 1 h nach HS zu beobachten ist, gut durch Hitze induzieren lässt.

4.3 Nachweis der Bindung von HSF1 an synthetische HSEs mittels ChIP-Assay

Es gibt zwei bekannte Hitzeschockfaktoren in *C. reinhardtii*. Dabei ist der Hitzeschockfaktor-1 jener, welcher maßgeblich an der Hitzeschockantwort, die auf Transkriptionslevel stattfindet, beteiligt ist (Schulz-Raffelt et al., 2007). Unter Stressbedingungen bindet der HSF1 Transkriptionsfaktor an den Promotorbereich von Hitzeschockgenen. Die Bindungsstellen der Hitzeschockgene sind cis-regulierende Elemente des Promotors, die sogenannten Hitzeschockelemente.

Um nachzuweisen, ob diese standardisierte Hitzeschockantwort für die Tatsache verantwortlich ist, dass das synthetische Hitzeschockelemente in achtfacher Wiederholung in *Chlamydomonas reinhardtii* zu einer erhöhten Expression führt, wurde mittels ChIP Assay die Bindung an den HSF1 getestet (Strenkert et al., 2011a). Dabei konnte, wie unter 3.6 im Ergebnisteil gezeigt ist, mittels PCR nachgewiesen werden, dass der Hitzeschockfaktor Antikörper an das synthetische HSE bindet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die konventionelle Hitzeschockantwort für die Funktionsweise der synthetischen Elemente in der Transgenexpression verantwortlich ist.

4.4 TagRFP

Die Expression des neuen Reporters tagRFP konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die Kernlokalisierung, welche durch eine Fusion des Reporters mit dem Gen für die Bleomycinantibiotikaresistenz hervorgerufen wird, konnte dabei anhand des fluoreszenzmikroskopischen Bilds, wie unter Abbildung 11 gezeigt, bestätigt werden (Calmels et al., 1993).

Ein erhebliches Problem, vor allem wenn es um die Messung des Hitzeschocks der synthetischen HSEs ging, war jedoch die Tatsache, dass bei nicht mehr intakten bzw. toten Zellen im Mikroskop ein Hintergrundsignal festgestellt wurde (vgl. Abbildung 17).

In diesen toten Zellen leuchtete anstatt des sonst gezeigten im Kern lokalisierten tagRFP nur die gesamte Zelle im Spektralbereich des tagRFP. Grund hierfür dürfte ein Zellabbauprodukt, möglicherweise ein Chlorophyllabbauprodukt, sein. Dies konnte durch den Vergleich der lichtmikroskopischen mit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme bestätigt werden. Die teils ausgelaufenen Zellen leuchteten im hellroten Bereich von tagRFP.

Der Abbau des Chlorophylls bei sterbenden bzw. toten Zellen in Blättern von höheren Pflanzen erfolgt größtenteils durch bekannte Stufen, welche durch Enzyme gesteuert werden. Am Anfang steht hierbei die Umwandlung des Chlorophyll a in Chlorophyllid a und Phytol. Dieses wird weiter umgesetzt in Pheophorbid a, welches ein Emissionsmaximum bei 675 nm aufweist. Der weitere Abbau erfolgt über die sogenannten roten Chlorophyll Catabolite (RCC), über fluoreszente Chlorophyll Catabolite (FCC) zu nicht fluoreszenten Chlorophyll Cataboliten (NCC). Chlorophyll b wird zunächst in Chlorophyll a umgewandelt und dann erfolgt der Abbauweg (Hörtensteiner et al., 1995; Rodoni et al., 1997; Matile et al., 1999; Takamiya et al., 2000; Pruzinska et al., 2011).

In *Chlamydomonas reinhardtii* wurden in Chlorophyll b-losen Mutanten zusätzliche Komponenten gefunden. Je nach Sauerstoffverfügbarkeit wurde entweder Pheophorbid a oder neuartige rote Pigmente wie das von Doi und Kollegen 2011 beschriebene P535 ins Medium sezerniert (Doi et al., 2001). Die Strukturen dieser Stoffe wurden nicht vollständig aufgeklärt. P535 liegt im Absorptionsmaximum bei 535, 385 und 275 nm (Doi et al., 1997; Doi et al., 2001; Kräutler et al., 2006; Harris et al., 2009b). Aufgrund der Hintergrundsignale durch Zellabbau bzw. Chlorophyllabbauprodukte konnte das Vorhaben die synthetischen Promotorkonstrukte HSEs-*RBCS2* nicht wie vorgesehen mit dem Plattenlesegerät analysiert werden. Grund dafür ist, dass bei der konstitutiven und verstärkt bei der durch Hitze induzierten Expression des tagRFP Reporters ein Hintergrundsignal durch abgestorbene Zellen auftritt, welches nicht vom eigentlichen Signal unterschieden werden kann.

Dies konnte bei der Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop und FACS ausgeschlossen werden. Somit wurde der vorliegende neuartige Fluoreszenzreporter in weiterer Folge ausschließlich dafür verwendet.

4.4.1 TagRFP Plattenlesegerät und ImageJ Auswertungen

Bevor die soeben beschriebene Problematik mit dem Hintergrundsignal durch absterbende Algenzellen bekannt war, sollte die Messung von tagRFP am Plattenlesegerät etabliert werden. Dies ist im Ergebnisteil unter 3.8.3/3.8.4 gezeigt. Dazu wurden die beiden Parameter Lampenintensität und Messzeit variiert. Aufgrund stark schwankender Messwerte kann davon ausgegangen werden, dass die Fluoreszenz des im Kern lokalisierten tagRFP im Vergleich zu Hintergrundsignalen durch diverse Abbauprodukte der Zellen zu schwach für eine reproduzierbare Messung am Plattenleser war.

Um den Reporter dennoch für Promotorstudien mit hohen Klonanzahlen und somit hohen Durchsatzraten verwenden zu können, wurde die Software ImageJ auf ihre Anwendbarkeit hin getestet (vgl. 3.8.5). Auch hierbei konnten durch die manuelle Auswahl der Flächen und des hohen Zeitaufwands kein geeignetes System für die Messung der tagRFP Expression etabliert werden. Anhand der vorliegenden Daten kann davon ausgegangen werden, dass tagRFP nicht für die Analyse von Promotoren, insbesondere nicht von hitzeinduzierbaren Promotoren verwendet werden kann.

Grund dafür ist, dass das Hintergrundsignal, zumindest an dem in dieser Arbeit verwendeten Plattenlesegerät der Firma Berthold, nicht vom eigentlichen Fluoreszenzsignal unterschieden werden kann. Somit ist eine Hochdurchsatzmessung in dieser Form nicht möglich.

4.4.2 FACS Analyse tagRFP am Gerät LSRFortessa™ der Firma BD

Zwei Klone, welche mit C5 und F4 bezeichnet wurden und den Reporter tagRFP enthielten, wurden wie im Ergebnisteil unter 3.8.7 beschrieben, im FACS analysiert.

Trotz des dabei nicht idealen Anregungslasers konnte ein Unterschied der beiden vorliegenden Klone per FACS festgestellt und anschließend anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme bestätigt werden. Der Grund für die erhöhte Fluoreszenz des Klons F4 könnte an der Integrationsstelle im Kerngenom der Alge liegen, da diese durch nicht homologe Rekombination zufällig ist und starke Variationen in der Expressionsstärke hervorrufen kann.

Außerdem wurde tagRFP als Fusionsprotein mit der Zeocinresistenz *ble* exprimiert (Stevens et al., 1996). Durch den doppelt so hohen Selektionsdruck mit 10 µg/ml des Antibiotikums beim Klon F4 könnte auch eine höhere Expression des Fluoreszenzproteins tagRFP erreicht worden sein.

4.4.3 Cell Sorting tagRFP am Gerät MoFlo Astrios des Herstellers Beckman

Nachdem prinzipiell bestätigt werden konnte, dass FACS Analysen mit *C. reinhardtii* Zellen funktionieren, sollte im nächsten Schritt ausgetestet werden, ob auch das Sorting der Zellen möglich ist (vgl. 3.8.7). Dazu wurde ein anderes Gerät mit dem idealen Anregungslaser für tagRFP verwendet.

Somit konnte anhand der FACS Analyse und begleitender Fluoreszenzmikroskopie festgestellt werden, dass sowohl beim *HSE8x-RBCS2* als auch beim *HSP70A-RBCS2* Promotor zwei Gruppen an tagRFP exprimierenden Zellen in einer Klonkultur vorhanden sind. Eine Gruppe mit schwächerer Fluoreszenz, bei welcher die Zellen zum Teil keine oder nur schwache Fluoreszenz an tagRFP im Kern aufwiesen.

Die zweite Gruppe mit hoher Fluoreszenz wies auch im Fluoreszenzmikroskop in allen Zellen durchwegs starke Fluoreszenz auf. Ziel der Sortierung war die Auftrennung dieser beiden soeben beschriebenen Gruppen und die anschließende Kultivierung. Nach einem Zeitraum von einem Monat sollten die zwei Kulturen erneut mittels FACS analysiert werden. Somit sollte der Einfluss von Silencing auf Einzelzellen untersucht werden. Allerdings konnte aufgrund von Kontaminationen, welche trotz Antibiotikamix im Medium auftraten kein erneutes Wachsen der Algengruppen erreicht werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen zum einen durch hohe Salzkonzentrationen beim Sortiervorgang teils abgestorben sind. Außerdem werden am Institut für Ökologie diverse Bakterien im FACS analysiert und sortiert. Dadurch steigt das Risiko einer verunreinigten Probe zusätzlich.

4.4.4 TagRFP im Vergleich mit mCherry

Der Reporter tagRFP sollte anschließend auch von *ble* getrennt exprimiert werden und somit im Cytoplasma lokalisiert sein. Dazu wurde die 2A Peptid Sequenz des Maul- und Klauenseuchevirus als Schnittstelle verwendet (Rasala et al., 2013).

Aufgrund der Tatsache, dass tagRFP im Kern lokalisiert nicht ohne erhebliches Hintergrundrauschen im Plattenleser gemessen werden konnte, wurde die Anwendung des Cytoplasma lokalisierten tagRFP daraufhin getestet. Anschließend erfolgte ein Vergleich von tagRFP im Kern und Cytoplasma lokalisiert mit mCherry. Ergebnis war, dass zwar beide Fluoreszenzproteine im Kern lokalisiert und auch, durch die 2A Schnittstelle, im Cytoplasma lokalisiert vorhanden waren. Dies konnte anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nachgewiesen werden.

Allerdings konnte aus mehreren Gründen keine Messung im Plattenleser wie in Rasala 2013 beschrieben, reproduziert werden. Zum einen wurde der verwendete Plattenleser, Mithras LB940 als nicht geeignet eingestuft, da er nicht über die Möglichkeit verfügt Chlorophyllautofluoreszenz zu messen und zum anderen keine Verstärkung des Signals, wie dies etwa auch im Fluoreszenzmikroskop einstellbar ist, durchgeführt werden kann.

Aus den gegebenen Gründen konnte bisher keine Aussage über die bessere Anwendbarkeit von tagRFP aufgrund von zu erwartender intensiver Helligkeit getroffen werden (Shaner et al., 2004).

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Um *C. reinhardtii* als Expressionssystem für Nischenprodukte wie orale Impfstoffe zu etablieren wurden in dieser Arbeit anhand von Reporterstudien ausgewählte *Chlorella*-Virus- Promotoren und neuartigen synthetischen Hitzeschockelementen in Kombination mit *RBCS2* Promotor getestet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass synthetische Hitzeschockelemente zu verstärkter Transgenexpression in *C. reinhardtii* führten. Da HSE8x-*RBCS2* reproduzierbar 1 h nach dem Hitzeschock bei 40°C zu erhöhter Expression des Reporters führte, wird dieses Promotorelement verstärkt für Anwendungen bei denen schwächere Basalexpression und verstärkte hitzeinduzierte Expression gewünscht ist, dienen. Dies tritt beispielsweise bei Toxizität durch Fremd-Proteinprodukte auf. HSE1x-*RBCS2* konnte in dieser Arbeit als sehr stark basal exprimierendes Promotorelement identifiziert werden. Diese zum einen basal starke Erhöhung der Expression als auch jene durch die Induktion mittels Hitze bedeuten einen weiteren wichtigen Schritt bei der Etablierung von *C. reinhardtii* als Expressionssystem für Nischenprodukte der Biotechnologie. Außerdem können diverse andere Zellvorgänge durch starke induzierbare Promotoren besser untersucht und geklärt werden. Der nächste wichtige Schritt bei der Anwendung dieser synthetischen HSEs-*RBCS2* Promotoren wäre die Reproduktion der Induktion mittels Hitzeschock bei unterschiedlichen Temperaturen für verschiedene Zeitdauer, um dabei die möglichst besten Parameter zu identifizieren und die Expression möglicherweise noch weiter steigern zu können.

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit war die Etablierung von tagRFP als neuartigen Reporter im Kern der Grünalge. Dadurch konnten Einzelzellmessungen am FACS und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen möglich gemacht werden. Durch das Sortieren der Einzelzellen und die anschließende Kultivierung können im nächsten Schritt durch die Optimierung der Gerätebedingungen und der anschließenden Kultivierung Genstilllegungsmechanismen besser untersucht werden.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Medien und Pufferlösungen

TAP Medium (Gorman and Levine 1965)

- 1 M Tris Base 20 ml
- Phosphatpuffer 1 ml (108 g/l K_2HPO_4 und 56 g/l $K_2H_2O_4$)
- Hutners Spurenelemente 1 ml
- Nutrient Stock 10 ml (40 g/l NH_4Cl , 10 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und 5 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- Eisessig 1 ml (pH 7) und ~ 100 μ l

Auf 1 l destilliertes Wasser

(Gorman et al., 1965; Harris et al., 2009a)

LB- Medium

- 0,1% Trypton
- 0,5% Hefeextrakt
- 1%NaCl

SOC – Medium (Hanahan, 1983)

- 20 g/l Trypton
- 5 g/l Hefextrakt,
- 1 ml 1 M Natriumchlorid
- 0,25 ml 1 M Kaliumchlorid
- 97 ml destilliertes Wasser

Nach dem Autoklavieren wurden 1 ml 2 M Magnesium-Stock (sterilfiltriert) und 1 ml 2 M Glukose (sterilfiltriert) hinzugefügt.

Hutners Spurenelemente

- 50 g EDTA
- 22 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- 11,4 g H_3BO_3
- 5,06 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
- 1,61 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
- 1,57 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

- 1,10 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- 4,99 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

(Hutner et al., 1950)

TAE Puffer

- 40 mM Tris-Acetat
- 1 mM EDTA
- pH 8,2 mit Eisessig

Inoue Puffer

- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (55 mM)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (15 mM)
- KCl (250mM)
- PIPES (pH= 6,7) (10 mM)

KH Puffer ChIP

- 20 mM Hepes-KOH pH 7,6
- 80 mM KCl

Crosslinking Lösung ChIP

- 20 mM Hepes-KOH pH 7,6
- 80 mM KCl
- 0,35% Formaldehyd

Lysispuffer ChIP

- 1% SDS
- 10 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 0,25x Protease Inhibitor Cocktail

Washing Puffer1 ChIP

- 150 mM NaCl
- 0,1% SDS
- 1% Triton X-100
- 2 mM EDTA (pH 8,0)

Washing Puffer2 ChIP

- 500 mM NaCl
- 0,1%SDS

- 1% Triton X-100
- 2 mM EDTA (pH 8,0)

Washing Puffer3 ChIP

- 250 mM LiCl
- 1% Nonidet p40
- 1% Na-Deoxycholat
- 1 mM EDTA (pH 8,0)
- 10 mM Tris HCl (pH 8,0)

TE Puffer ChIP

- 10 mM Tris HCl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

CHIP Puffer ChIP

- 1,1% Triton X-100
- 1,2 mM EDTA
- 167 mM NaCl
- 16,7 mM Tris HCl (pH 8,0)

Lysis Puffer ChIP

- 1% SDS
- 10 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Elutionspuffer ChIP

- 1% SDS
- 1 M NaHCO_3

Enzympuffer für Luciferase Standard

- 250 mM Na_2HPO_4
- 30 % Glycerin

Assaypuffer für Luciferase Standard

- 0,5 M NaCl
- 0,1 M Na_2HPO_4
- 1 mM Na_2EDTA
- 0,02% BSA
- 0,6 mM NaN_3 (pH 7,6)

5.1.2 Chemikalien

Agar (bacteriological)	Scharlau Chemie S.L. Barcelona (E)
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Ammoniumhetamolybdat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Antarctic Phosphatase Puffer (10x)	New England BioLabs Massachusetts (USA)
(L-)Arginin für die Biochemie	Merck Pharma Darmstadt (D)
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
BSA	Sigma Aldrich Missouri (USA)
Calciumchloriddihydrat	Scharlau Chemie S.L. Barcelona (E)
Chelex-100	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Cobalt (II)-Chlorid- Hexahydrat	Scharlau Chemie S.L. Barcelona (E)
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
dNTP Mix 2/10 mM	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Eisen (II) Sulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Ethanol (absolut)	AustrAlco GmbH Spillern (A)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Fast Digestion Puffer (10x)	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Glaskugeln (Durchmesser 0,4-0,6 mm)	Sartorius Göttingen (D)
Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Glycogen	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Herculase II Puffer	Agilent Technologies Santa Clara (USA)
Hygromycin	InvivoGen San Diego (USA)
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Pharma Darmstadt (D)

Kaliumhydroxyd	Sigma Aldrich Missouri (USA)
Kanamycinsulfat	Merck Pharma Darmstadt (D)
KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Klenow Puffer (10x)	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Kupfer (II)-Sulfat-Pentahydrat	Scharlau Chemie S.L. Barcelona (E)
LambdaDNA	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Lithiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Loading Puffer (6x)	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
MgCl ₂	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Na-deoxycholate	Sigma Aldrich Missouri (USA)
NaHCO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Nonidet P40	Roche Diagnostics GmbH Mannheim (D)
Paromomycin	Sigma Aldrich Missouri(USA)
PEG 6000	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Pipes	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH Mannheim (D)
ProteinA Sepharaose beads	Sigma Aldrich Missouri (USA)
ProteinaseK	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Puffer Cre Rekombinase (10x)	New England Biolabs Ipswich (USA)
RNAse A	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
TAE Puffer (50x)	Biorad Laboratories GmbH München (D)
Taq Polymerase Puffer+KCl	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
T4 Ligase Puffer (10x)	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
T4 Ligase Puffer (2x)	Promega Corporation Madison (USA)
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)
Zeocin	InvivoGen San Diego (USA)
Zinksulfatheptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe (D)

5.1.3 Bakterienstämme

DH5α-Stamm Invitrogen Lot:18263012

Genotyp: F⁻ Φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 rec A1 end A1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA sup E44
thi-1 gyr A96 rel A1 λ⁻

(Invitrogen Homepage a, 2015)

One Shot® PIR1 Chemically Competent E. coli Invitrogen Lot: C1010-10

Genotyp: F- Δlac169 rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMlul)::pir-116

(Invitrogen Homepage b, 2015)

5.1.4 Algenstämme

302cw15arg⁻ Stamm (zellwandloser Mutant - mit Defekt in der Argininproduktion) - Labor

Prof. Dr. Peter Hegemann Humboldt Universität Berlin - aus Algensammlung Chlamy.org

CC-4350 cw15 ARG7-8 mt+ [Matagne 302]

(Chlamydomonas Ressource Center, 2015)

5.1.5 Enzyme/DNA Größenmarker

Antarctic Phosphatase	New England BioLabs Massachusetts (USA)
Cre Rekombinase	New England Biolabs Ipswich (USA)
Coelenterazin	PJK GmbH Kleinblittersdorf (D)
Fast Digest Enzyme	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Gene Ruler DNA ladders	Thermo Scientific Massachusetts (USA)

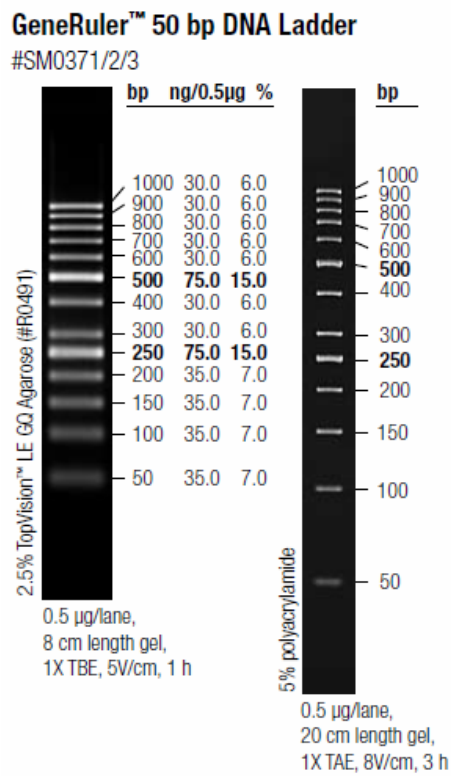


Abbildung 24: 50 bp Marker (Thermo Scientific, 2015b)

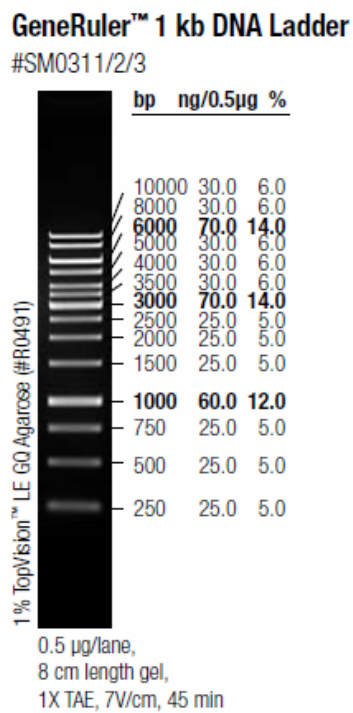


Abbildung 25: 1 kbp Marker (Thermo Scientific, 2015a)

HerculaeII DNA Polymerase	Agilent Technologies Santa Clara (USA)
Klenow Fragment	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Renilla reniformis Luciferase	PJK GmbH Kleinbittersdorf (D)
Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific Massachusetts (USA)

5.1.6 Antikörper

HSF1	Prof. Michael Schroda Universität Kaiserslautern
HistonH3	Abcam AG Cambridge (UK)

5.1.7 Plasmide

Plasmide für Fusion

pXX186	Das Plasmid besitzt loxP Erkennungssequenz, Kanamycinresistenz, Codon optimierte Luciferase und PIR1ORI - dieses Plasmid dient als Grundlage für pMCI7-pMCI12 (Heitzer et al., 2007b)
pXX208	Das Plasmid besitzt Argininselektionsmarker Ampicillinresistenz, loxP Erkennungssequenz und PUC18ORI (Heitzer et al., 2007b)
pMS188	Plasmid aus dem Labor von Prof. Michael Schroda Universität Kaiserslautern - enthält den Promotor <i>HSP70A</i> lang, Zeocinresistenz, Ampicillinresistenzgen und PUC18ORI

Grundplasmide mit Viruspromotoren

pMCI7	pXX 186 mit DNA Topoisomerase Promotor aus Chlorella Virus <i>PBCV I</i>
pMCI8	pXX 186 mit Coat Like Protein Promotor aus Chlorella Virus <i>PBCV I</i>
pMCI10	pXX 186 mit K ⁺ -Ionenkanal Protein Promotor aus <i>Chlorella</i> Virus <i>PBCV I</i>
pMCI11	pXX 186 mit DNA Polymerase Promotor aus <i>Chlorella</i> Virus <i>PBCV I</i>
pMCI12	pXX 186 mit Chitinase Promotor aus <i>Chlorella</i> Virus <i>PBCV I</i> (Jacob, 2007)

Fusionsplasmide mit Viruspromotoren

pMCI13	Fusionsplasmid aus pXX208 und pMCI7
pMCI14	Fusionsplasmid aus pXX208 und pMCI8
pMCI16	Fusionsplasmid aus pXX208 und pMCI10
pMCI17	Fusionsplasmid aus pXX208 und pMCI11

pMCI18 Fusionsplasmid aus pXX208 und pMCI12

Fusionsplasmide - Kontrollen für Viruspromotoren

pMCI26 Fusionsplasmid aus pXX208 und pXX186 (Negativkontrolle ohne Viruspromoter)

pMCI27 Fusionsplasmid aus pXX208 und pXX186-luc (Negativkontrolle ohne Luciferase)

(Heinek 2009)

pXX209 Fusion aus pXX208 und pXX186 (Positivkontrolle)

pXX250 Fusion aus pXX208 und pXX186+Introns und ARS-RLuc und RLucHSV

Grundplasmide mit Heat Shock Elementen

pMCI50 pXX186 ohne Heat Schock Promotor

pMCI51 pXX186 mit Rubisco und Heat Shock Element 8x (von pSGH2) ohne *HSP70A*

pMCI52 pXX186 nur mit Heat Shock Element 8x (von pSGH2) ohne *RBCS2* und ohne *HSP70A*

pSGH2 Plasmid aus dem Labor von Prof. Thomas Czerny FH Campus Wien - enthält achtfaches Heatshock Element, Cauliflower Mosaic Virus Promotor, Ampicillinresistenz und GFP

pMCI94-99 Plasmide mit HSE1x-6x ligiert mit *RBCS2*

pMlucF-

HSE1x-6x Plasmid aus dem Labor Prof. Thomas Czerny FH Campus Wien Ampicillinresistenz, Luciferase, SV40 Promotor, Fos Promotor, HSE1x-6x

pMCI106 Ligation aus pXX186 mit Promotor *HSP70A* lang aus pMS188

(Czerny et al., 2005)

Fusionsplasmide mit Heat Shock Elementen

pMCI53 Fusion aus pMCI50 mit pXX208 (HSE8x)

pMCI54 Fusion aus pMCI51 mit pXX208 (HSE8x)

pMCI55 Fusion aus pMCI52 mit pXX208 (HSE8x)

pMCI100-105 Fusion aus pMCI94-105 mit pXX208 (HSE1x-6x)

pMCI107 Fusion aus pMCI106 mit pXX208

Plasmide tagRFP

pXX37	Plasmid der Universität Regensburg Ampicillinresistenz, <i>HSP70A</i> : <i>RBCS2</i> , Luciferase, PUC18ORI, 3' UTR, <i>ble</i>
p463	Plasmid von Michel Goldschmidt - Clermont, Chloroplasten <i>aadA</i> , <i>tscA</i> , 5' <i>rbcl</i> , 3' <i>rbcl</i>
pMCI76-79	HSE8x in Kombinationen mit <i>RBCS2</i> und <i>HSP70A</i> +Kern tagRFP
pMCI80-91	HSE1x-6x in Kombinationen mit <i>RBCS2</i> und <i>HSP70A</i> +Kern tagRFP
pMK-RQ-crtagRFP	Plasmid der Firma Eurofins Genomics mit synthetischem crttagRFP
cp_RFP-pMK	Plasmid der Firma Eurofins Genomics mit synthetischem cptagRFP
pMCI92	Ligation aus cp_RFPpMK und p463 - enthält <i>tscA</i> , 5' <i>rbcl</i> , 3' <i>rbcl</i> und cpRFP
pMCI93	Ligation aus PCR Produkt aus pMCI92 und p463, enthält <i>tscA</i> , 2x 5' <i>rbcl</i> , 3' <i>rbcl</i> , <i>aadA</i> und cpRFP
pMCI110	Ligation aus pexK4-mCherry und pMCI76 - enthält <i>ble2A</i> -tagRFP und <i>HSP70A-RBCS2</i> Promotor

Plasmide mCherry

pBR9mCherry	Beth Rasala, Labor Prof. Stephen Mayfield, Abteilung Molekularbiologie, University of California San Diego
pEx-K4mCherry	Plasmid mit synthetischem Kern - codon optimiertem mCherry - Firma Eurofins Genomics
pMCI108	Ligation aus pexK4-mCherry und pMCI76 - enthält <i>ble2A</i> -mCherry und <i>HSP70A-RBCS2</i> Promotor
pMCI109	Ligation aus pexK4-mCherry und pMCI76 - enthält <i>ble</i> , mCherry und <i>HSP70A-RBCS2</i> Promotor

Die verwendeten Plasmide sind auch in den Tabellen im Anhang nochmals zusammengefasst.

5.1.8 Kit Systeme für die DNA Aufreinigung

NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co KG Düren (D)
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co KG Düren (D)
NucleoTrap® Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co KG Düren (D)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System	Promega Corporation Madison (USA)

5.1.9 Oligonucleotide

Primer P463 5-3 *NotI* for

5'-GTG ATC CGC GGC CGC ATG GGT TTA TAG GTA TTT TGA GAC C-3'

(Dreesen et al., 2010)

Primer P463 5-3 *SacI* rev

5'-GTG ATC CGA GCT CGT ATG TTA CTA TTT CTT TTA TTA CTT ATA AAA TAT AAT AC-3'

(Dreesen et al., 2010)

Primer cpRFP for

5'-TCG TAT GGT GAG CAA GGG CG-3'

Primer cpRFP rev

5'-TTA CTT GTA CAG CTC ATC CAT ACC-3'

Primer tagRFP for

5'-ATG GTG TCC AAG GGC GAG GAG-3'

Primer tagRFP rev

5'-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC G-3'

Primer Intron *RBCS2* rev

5'-GCTAGCCCAGGTGAGTCGACGAGC-3'

Primer HSEsyn for

5'AGAGCTCCGGATCCGTCGACGTT3'

Primer HSEsyn rev

5'AAAAAGCTAGC CAGATCTCGAGAACGTTTC 3'

Primer HSE8xfor

5'TCTAGTCGACCTCGAAACG 3'

Primer HSE8xrev

5'CCCCCTCGACGTTCTAG 3'

Primer HSP70A for

5'GAGCTCGCTGAGGCTTGA 3'

Primer HSP70A rev

5'TCTTAAGCTAGCTGAGTGGTTA3'

Primer HSE8x for

5'A GAGCTC TCT AGT CGA CCT CGA AAC G3'

Primer HSE8x rev

5'AAAA GCTAGC CCC CCT CGA CGT TCT AG3'

Primer Intron pXX186 for

5'AAAA GCTAGC CCA GGT GAG TCG ACG AGC3'

Primer Intron pXX186 rev

5'AA CTCGAG GCA TCC TGC AAA CGG3'

5.1.10 Geräte

Abzug	Köttermann Wien (A)
Anregungsfilter GFP 450 nm	Chroma Technology Vermont (USA)
Anregungsfilter tagRFP Ex D540/25x	Chroma Technology Vermont (USA)
Cell Sorter MoFlo Astrios	Beckman Coulter GmbH Wien (A)
Emissionsfilter GFP EM-F 485	Chroma Technology Vermont (USA)
Emissionsfilter tagRFP EmD580/25m	Chroma Technology Vermont (USA)
FACS LSRFortessa™	BD Bioscience (USA)
Filter Cube 49004 ET-CY3/ R C151462	Nikon Instruments New York (USA)
Filter Cube GFP-LP- EX 480/40, DM505 BA510	Nikon Instruments New York (USA)
Filter Cube 49004_Nikon TE2000/ Ti/50i_Mounted ET-Cy3	
ET545/25x, ET605/70m T565lpxr	Nikon Instruments New York (USA)
Fluoreszenzmikroskop- Beleuchtungsanlage Intensilight C-HGFI	Nikon Instruments New York (USA)
Fluoreszenzmikroskop Eclipse 50i	Nikon Instruments New York (USA)
Fluoreszenzmikroskop- PC-use Control unit DS-U3	Nikon Instruments New York (USA)
Fluoreszenzmikroskop-Kamera DS-Fi1c	Nikon Instruments New York (USA)
Gelkammer Biorad Wien (A)	
Lampen Master TL-D 90 18W/940	Phillips Amsterdam (NL)
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG Hamburg (D)
NanoDrop	Thermo Scientific Massachusetts (USA)
Pipetten Ergo One	Starlab GmbH Hamburg (D)

Plattenlesegerät Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co KG Bad Wildbad (D)
Plattenlesegerät Fluorostar Omega	Bmg Labtech GmbH Ortenberg (D)
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	
KS12	Thermo Electron Corp Massachusetts (USA)
Sonifier Sonopuls HD 2070	Bandelin electronic GmbH & Co KG Berlin (D)
mit der Spitze MS 73	
Vortex Genie2	Scientific Ind New York (USA)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG Hamburg (D)
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich GmbH & Co KG Tuttlingen (D)

5.2 Methoden

5.2.1 Restriktionsverdau und Auftrennung auf dem Agarosegel

Um Plasmide zu überprüfen wurde ein analytischer Restriktionsverdau mit *Fast Digest* Enzymen der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Es wurden dabei ca. 1 ng DNA mit 0,5 µl Enzym in einem 10 µl Ansatz verdaut. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C in *Fast Digest* Puffer. Anschließend wurde ein 1,5% Agarosegel mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und gegossen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 100 V für 50-60 min.

5.2.2 Isolierung von Plasmid DNA

Um Plasmid DNA zu isolieren, wurde eine Übernachtskultur der von den Platten isolierten Klone in flüssigem LB-Medium, welches mit Kanamycin (30 µg/ml) bzw. Ampicillin (100 µg/ml) versetzt wurde, gezüchtet.

Die Isolation erfolgte mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit von Macherey-Nagel laut Protokoll des Herstellers (Macherey- Nagel, 2015a).

5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA Fragmenten aus dem Agarosegel

Um Plasmid-DNA Fragmente aus einem Agarosegel isolieren zu können, wurde mithilfe eines Skalpell das gewünschte Stück aus dem Gel geschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des DNA Stücks mithilfe des Extraktionskits NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up von Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, 2015b).

5.2.4 Polymerasekettenreaktion mithilfe der Taq Polymerase

Für die PCR wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

dNTP Mix	0,2 mM
Primer forward	10 pmol
Primer reverse	10 pmol
10x Taq DNA Polymerasepuffer+KCl	1x
MgCl ₂	2 mM
Taq DNA Polymerase	2 U

Die PCR lief mit folgendem Thermocyclerprogramm ab:

Initiale Deaktivierung bei 95°C

95°C Deaktivierung

Annealing Temperatur

72°C Verlängerung- je nach Größe ca. 1 min pro 1 kbp

} x Zyklen

72°C Finale Verlängerung

Bevor die PCR gestartet wurde, wurde der Deckel des Thermocyclers auf 105°C vorgeheizt, um Kondensation zu vermeiden. Nachdem das PCR Programm fertig war, kühlte der Thermocycler auf 4°C ab (Mullis et al., 1986; Thermo Scientific, 2015e).

5.2.5 Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Um einer Eigenligation des Vektors vorzubeugen, wurde dieser vor der Ligation mithilfe der Antarctic Phosphatase des Herstellers New England Biolabs laut Protokoll inkubiert. Dabei wurden 10 µl Vektor-DNA mit 1 µl Enzym und 1 µl (10x) Puffer versetzt und der Ansatz bei 37 °C für 15 min inkubiert. Abschließend erfolgte die Inaktivierung bei 65°C für 5 min (New England Biolabs, 2015a).

5.2.6 Ligation von Plasmidvektor mit DNA Insert

Für die Ligation von Plasmid Vektor DNA mit einem gewünschten Insert wurden diese zunächst mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten, der Vektor dephosphoryliert und dann wurde die Ligation mittels T4 DNA Ligase des Herstellers Thermo Scientific laut Protokoll durchgeführt (Thermo Scientific, 2015d).

5 µl des Ligationsansatzes wurden in kompetente Bakterienzellen transformiert. Die Klone wurden mittels Kontrollverdau getestet.

5.2.7 *Blunt ends* mittels Klenow

Ein mittels Restriktionsenzymen verdautes und aus dem Gel aufgereinigtes DNA-Stück konnte mittels Klenow Fragment *blunt* gemacht und somit wieder zu einem Plasmidring ligiert werden. Für das *blunt* machen mit Klenow wurde folgender Ansatz pipettiert:

15 µl linearisierte und aus Gel aufgereinigte Plasmid DNA

2 µl 10x Reaction Puffer Klenow

0,5 µl dNTP Mix 2 mM

0,5 µl Klenow Fragment

2 µl Nuclease freies Wasser

Es folgten eine Inkubation für 10 min bei 37°C und anschließend ein Inaktivierungsschritt bei 75°C für 10 min.

Nachdem das DNA Fragment *blunt* gemacht worden war, folgte eine Aufreinigung laut Macherey-Nagel Nucleo Spin® ExtractII, um Puffer- und Enzymreste zu entfernen. Für die anschließende Religation wurden 10 µl aufgereinigter Klenow Ansatz mit 10 µl 2x T4 Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase bei 16°C über Nacht inkubiert (Thermo Scientific, 2015c).

5.2.8 Fusion zweier Plasmide mittels *Cre Rekombinase* Reaktion

Um Plasmidderivate von pXX186, welche das Reportergen *Renilla* Luciferase und den jeweils zu testenden Promotor enthielten, mit pXX208, welches das ARG7 Gen für die Selektion in Algenzellen enthält, zu fusionieren, wurde das Enzym Cre-Rekombinase von New England Biolabs verwendet (New England Biolabs, 2015b). Die Fusion erfolgte laut Protokoll, wobei hierbei die DNA Konzentrationen abgeändert wurden. Diese Plasmid DNA wurde mit 1 µl Cre-Rekombinase und 2 µl Cre Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Inaktivierung der Cre-Rekombinase durch Inkubation bei 65°C für 10 min. Die Selektion erfolgte dann durch Transformation der Cre Ansätze in *DH5α*-Bakterienzellen, welche auf LB- Kanamycin Platten ausplattiert wurden. Auf diesen Platten wachsen nur Klone, welche das Fusionsplasmid aufgenommen haben. Dies ist deshalb der Fall, da die Kanamycin Resistenz aus dem pXX186 Derivat stammt und der benötigte *origin of replication* - pUC18, ohne den die *DH5α*-Zellen nicht lebensfähig sind, aus dem pXX208 Vektor (Liu et al., 1998).

5.2.9 Herstellung kompetenter DH5 α -Bakterienzellen mittels Inoue Methode

Die Herstellung kompetenter *DH5 α* -Bakterienzellen erfolgte mittels Inoue Methode. Dabei wurde im ersten Schritt eine Übernachtskultur bei 37°C auf LB-Agar Platten inkubiert. Von dieser Platte wurde anschließend eine Kolonie gepickt und in 25 ml LB-Medium resuspendiert, welche dann für ca. 8 h bei 37°C/120 rpm inkubiert wurde. Von dieser Starterkultur wurden 4, 6 und 10 ml entnommen und damit drei neue Ansätze, welche je 250 ml LB-Medium enthielten vorbereitet. Diese Flüssigkulturen wurden anschließend über Nacht bei 18°C/120 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ der drei Kulturen gemessen bis sie bei einer der Kulturen bei 0,55 lag. Diese Kultur wurde für 10 min auf Eiswasser gestellt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 10 min. Das Medium wurde entfernt und das getrocknete Pellet in 80 ml eiskaltem Inoue Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation und danach wurde das getrocknete Pellet in 20 ml eiskaltem Inoue Puffer gelöst. Es wurden 1,5 ml DMSO zugegeben und das Zellgemisch 10 min auf Eis gestellt. Abschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert (Inoue et al., 1990).

5.2.10 Transformation in DH5 α Bakterienzellen

Die Transformation der Plasmide mit *Puc18 Origin of Replication* in *DH5 α* erfolgte mittels Hitzeschock laut Protokoll des Herstellers. Dazu wurden 100 μ l kompetente Zellen in 15 ml Falcon Tubes pipettiert und 5 μ l Ligationsansatz beigefügt. Der Ansatz wurde dann 30 min auf Eiswasser inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 90 s. Nach der Zugabe von 500 μ l SOC-Medium wurden die Zellen 45 min bei 37°C/150 rpm inkubiert. Anschließend wurden 250 μ l des Ansatzes auf eine Selektivplatte (100 μ g/ml Ampicillin bzw. 30 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert (Invitrogen Homepage a, 2015).

5.2.11 Transformation in Pir1 Bakterienzellen

Die Transformation der Plasmide mit *R6ky Origin of Replication* in *Pir1* erfolgte mittels Hitzeschock laut Protokoll des Herstellers. Dabei wurde ähnlich wie bei *DH5 α* Zellen vorgegangen. Allerdings wurden die Zellen direkt beim Hersteller gekauft und der Ansatz im gelieferten Gefäß durchgeführt, da diese Zellen empfindlich auf Scherkräfte durch Pipettieren reagieren (Invitrogen Homepage b, 2015).

5.2.12 Cryokonservierung von Bakterienzellen

Um Bakterienzellen über lange Zeiträume aufbewahren zu können, wurden 750 µl Flüssigkultur mit 250 µl 86% Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Kulturen bei -80°C aufbewahrt.

5.2.13 Sequenzierung

Alle Plasmide, welche mit PCR Fragmenten kloniert wurden, wurden vor der Transformation in *C. reinhardtii* bei Eurofins Genomics sequenziert.

5.2.14 Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Kultivierung erfolgte in TAP-Flüssigmedium plus 100 µg/ml Arginin bei 25°C unter Schütteln bei 120 rpm und Dauerbelichtung. Zur längeren Lagerung wurden die Stämme auf TAP-Agar-Platten oder auf Schrägagar ausplattiert. Nach der Transformation wurden die Klone von den Selektivplatten auf 48 *well* Platten mit TAP-Agar unter Selektionsdruck überführt. Für die Messungen der Reportergene wurden diese Platten verwendet, um 48 *well* Platten mit Flüssigselektionsmedium zu beimpfen.

5.2.15 Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Transformation in den arginindefizienten Algenstamm *302cw15arg7* erfolgte laut Protokoll von Kindle 1990. Dabei wurde 50 ml Flüssigkultur mit einer Zellzahl von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet. Diese wurde bei 2500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 1 ml dekantiert und die Zellen im Restvolumen resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden jeweils 300 µl Zellen mit 1 µg linearisierter DNA versetzt. Die DNA und die Zellen wurden in ein Eppendorfcup mit 300 mg Glaskugeln, die mit Ethanol gewaschen und autoklaviert wurden, pipettiert. Es wurden 100 µl PEG 6000 (20%) zugegeben und der Ansatz für 15 s gevortext.

Bei Ansätzen mit Antibiotikaresistenzplasmiden wurden die Zellen über Nacht in 50 ml Nicht-Selektivmedium kultiviert. Am nächsten Tag, nach einer erneuten Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min, wurde das in 0,5 ml Medium gelöste Pellet auf Selektivplatten ausplattiert. Dabei wurden pro Ansatz mindestens fünf verschiedene Mengen (25, 50, 75, 100 µl und Restvolumen) auf die Platten aufgebracht.

Bei Selektion auf Argininauxothropie wurde der Ansatz ohne Übernachtskultur direkt auf Selektivplatten ausplattiert (Kindle, 1990).

5.2.16 Zellzahlbestimmung mittels Thomakammer

Um für den ChIP Assay die Zellzahl zu bestimmen wurde eine Thomakammer verwendet. Eine Zählereinheit besteht bei diesem dicken plangeschliffenen Objektträger aus einem Großquadrat mit 16 Gruppenquadraten, welche in 25 Kleinstquadrate unterteilt sind. Nachdem die Algenflüssigkultur in beide Stege eingetroppt wurde, wurden die Kleinstquadrate ausgezählt. Die Zellzahl ergibt sich dann aus nachstehender Formel.

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Kleinstquadrate}} * 400 * 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

5.2.17 Linearisierung von Plasmid DNA für die Algentransformation

Bevor die in *E. coli* klonierten Plasmide in *Chlamydomonas reinhardtii* transformiert wurden, wurden diese zunächst mittels Restriktionsenzymen geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass nach Möglichkeit die bakteriellen Resistenzgene wegfallen und nur der entstehende DNA Abschnitt, welcher Promotor, Reporter und Selektionsmarker für die Grünalge enthält, laut Protokoll des Macherey-Nagel Kits Gel and PCR Clean up aus dem Gel aufgereinigt wurde. Dieser linearisierte Bereich wurde anschließend für die Transformation verwendet (Macherey-Nagel, 2015b).

5.2.18 Konzentrationsbestimmung der linearisierten DNA

Die Bestimmung der DNA Konzentration der für die Transformation in *C. reinhardtii* zuvor linearisierten Plasmid DNA erfolgte mithilfe einer NanoDrop Messeinheit der Firma Thermo Scientific. Dabei wurde zum einen die Konzentration bei 260 nm und zusätzlich die Reinheit der DNA über das Verhältnis 260/280 nm bestimmt. Ein Wert von 1,8 gilt dabei als reine DNA.

5.2.19 Isolierung von DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Bevor die Algenklone für die genomische PCR verwendet werden konnten, wurden diese mittels Chelex Methode (Cao et al., 2009) behandelt um die DNA zu isolieren. Dabei wurden 100 µl Flüssigkultur bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl 5% Chelex-100 resuspendiert. Anschließend erfolgte ein Vortexschritt für 10 s und eine Inkubation bei 99°C für 10 min. Nach dem Erhitzen wurde die Algenprobe erneut für 10 s gevortext. Abschließend wurde der Ansatz bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert und 1 µl des Überstandes für die genomische PCR verwendet (Cao et al., 2009).

5.2.20 Genomische PCR- *Chlamydomonas reinhardtii*

Um das Transgen im Kerngenom nachzuweisen, wurden die Zellen im ersten Schritt mittels Chelex Kugeln laut Protokoll (Cao et al., 2009) aufgebrochen. Anschließend wurde die PCR mit 1 µl Zelllysats durchgeführt. Dabei wurden, wenn nicht anders angegeben, folgende Reagenzien eingesetzt:

dNTP Mix	0,2 mM
Primer forward	10 pmol
Primer reverse	10 pmol
10x Taq DNA Polymerasepuffer+KCl	1x
MgCl ₂	2 mM
DMSO	1 mM
(Frackman et al., 1998)	
Taq DNA Polymerase	2 U

Die PCR lief mit folgendem Thermocyclerprogramm ab:

Initiale Deaktivierung bei 95°C für 5-10 min

95°C Deaktivierung	}	40 Zyklen
Annealing Temperatur		
72°C Verlängerung - je nach Größe ca. 1 min pro 1 kbp		
72°C Finale Verlängerung		

5.2.21 Erstellen der Luciferase Standardgeraden

Um eine Aussage über die Reportergenkonzentrationen treffen zu können wurde mit einer aus *E. coli* aufgereinigten *Renilla* Luciferase der Firma PJK eine Standardgerade erstellt. Dazu wurde das Enzym in dem entsprechenden Puffer (siehe Materialien) gelöst und eine Verdünnungsreihe von 10 µg/ml bis 10 pg/ml ausgehend von 1 mg/ml erstellt. Somit wurden folgende Konzentrationen für die Standardgerade verwendet:

- 1 µg
- 100 ng
- 10 ng

- 1 ng
- 100 pg
- 10 pg

5.2.22 Kinetikmessungen Luciferase

Für die Luciferaseenzymreaktion sollte die Kinetik bestimmt werden, um Rückschlüsse auf die einzusetzende Substratkonzentration ziehen zu können. Ziel hierbei ist es, ein konstantes Signal und genügend Substrat gewährleisten zu können. Dazu wurde aufgereinigte *Renilla* Luciferase der Firma PJK verwendet und in unterschiedlichen Puffersystemen und mit diversen Coelenterazinkonzentrationen die Kinetik bestimmt.

5.2.23 Plattenlesermessungen Algenklone

Die Messungen der Expressionsstärke der Promotoren erfolgte mittels Messungen der Lichtintensität von *Renilla* Luciferase beziehungsweise anhand der Fluoreszenz bei tagRFP am Plattenleser Mithras LB940. Für die Messung der Lumineszenz wurde im ersten Schritt das Substrat Coelenterazin (CTZ) in Methanol (96%) gelöst. Die Algenklone wurden in weißen Mikrotiterplatten der Firma Berthold technologies gemessen. Pro *well* wurden 100 µl Klon suspension mit 100 µl TAP Medium verdünnt.

Anschließend wurden mittels Injektor 10 µl Substrat (9,5 µM) zupipettiert. Die Lumineszenz wurde ohne Filter, nach orbitalem Schütteln für 0,1 s, für 5 s gemessen. Dabei wurden jeweils bis zu 96 Klone pro Konstrukt analysiert und anschließend der Mittelwert gebildet und in einem Diagramm samt Standardabweichung dargestellt.

Die Fluoreszenzmessung von tagRFP erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten. Die verwendeten Filter waren folgende: Anregungsfilter D540/25x und Emissionsfilter D580/25m. Hierbei wurde die Messung mit unterschiedlichen Lampenintensitäten, welche zwischen 0-75 Watt in digitalen Schritten zwischen 0-65535 eingestellt werden kann, und Dauer durchgeführt.

5.2.24 Absorptionsmessungen Plattenleser

Um die ungefähre Zelldichte zu bestimmen und damit sicherzustellen, dass die Klone in etwa ident angewachsen sind, wurde vor der Lumineszenzmessung die Absorption bei 450 nm gemessen.

5.2.25 Fluoreszenzmikroskopie

Der Nachweis der Funktionalität von tagRFP wurde im ersten Schritt im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Dabei wurden 5 µl einer Flüssigkultur von *C. reinhardtii* verwendet. Nach den lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mit den entsprechenden Filterwürfeln für tagRFP und Chlorophyll laut Geräteliste. Als Lichtquelle diente wie bereits angegeben eine Quecksilberlampe, wobei tagRFP bei höchster Lampenintensität und Chlorophyll bei mittlerer Stärke sichtbar gemacht wurden.

5.2.26 Auswertung der Fluoreszenz mit ImageJ

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität mittels ImageJ erfolgte anhand mikroskopischer Aufnahmen, welche immer mit denselben Einstellungen erfasst wurden. An diesen Bildern wurde zunächst manuell eine ROI ausgewählt. Damit konnte die Fläche, mittlere Intensität und Standardabweichung der Fluoreszenz von tagRFP und Chlorophyll bestimmt werden. Anschließend konnte durch die Multiplikation der Fläche mit der mittleren Intensität die Intensität der gesamten Fläche pro Klon bestimmt werden. Durch Addition der Intensität der Fläche von allen Klonen erhält man dann die Gesamtfläche mit der dementsprechenden Intensität. Abschließend wird die Intensität der Gesamtfläche durch die Gesamtfläche d.h. die Summe der einzelnen Flächen je Klon dividiert um auf die Intensität zu kommen. Diese Schritte wurden sowohl für tagRFP, als auch für Chlorophyll durchgeführt und anschließend in Relation zueinander gestellt. Hierbei erfolgte eine Normalisierung auf die Zellgröße.

5.2.27 Hitzeschock

Nachdem die Promotoren auf ihre konstitutive Expression hin getestet wurden, wurde im nächsten Schritt der Hitzeschock durchgeführt. Dieser erfolgte in Eppendorfcups im Wasserbad bei 40°C für 15-60 min. Anschließend wurden die Klone über einen Zeitraum von bis zu 5 h weiter kultiviert und zwischenzeitlich die Expression des Reportergens im Plattenleser gemessen. Die Substratkonzentration betrug hierbei 9,5 µM und die Messzeit 5 s.

5.2.28 Fluorescence Activated Cell Sorting

Die Analyse der fluoreszierenden tagRFP Klone erfolgte am Institut für Ökologie der Universität Innsbruck, Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Ruben Sommaruga. Verwendet wurde hierbei der Cell Sorter MoFlo Astrios der Firma Beckman Coulter. Die verwendeten Laser waren für tagRFP: 561 nm Laser, Filter: 610/20 nm und für die Chlorophyllautofluoreszenz 488 nm Laser, Filter: 680/20 nm.

5.2.29 ChIP Assay

Um die Bindung zwischen synthetischen Hitzeschockelementen (HSEs) und dem *Chlamydomonas reinhardtii* internen Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) nachzuweisen, wurde eine Chromatin Immunopräzipitation laut Strenkert und Kollegen durchgeführt (Strenkert et al., 2011a). Dabei wurde der entsprechende Algenstamm in 400 ml TAP bei 25°C unter Dauerlicht bis zu einer Zelldichte von $4-8 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert. Durch die Zugabe und Inkubation mit Crosslinking Lösung erfolgte das Formaldehyd Crosslinking. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in Lysispuffer gelöst und die Fragmentierung der DNA erfolgte mittels Bandelin Sonifier laut Protokoll. Nachdem die DNA Fragmentierung mittels Gel überprüft wurde, erfolgte die Vorbereitung der Protein A Sepharose Beads und die Herstellung der Antikörperlösung laut Protokoll. Anschließend erfolgte die eigentliche Chromatin Immunopräzipitation mit der vorbereiteten Antikörperlösung und den Sepharose beads. Nach den Waschschritten erfolgte die Elution mit dem entsprechenden Elutionspuffer. Das Eluat wurde anschließend aliquotiert und es wurden 5 M NaCl, 0,5 M EDTA, 1 M Tris HCl und ProteinaseK zugegeben, um das Crosslinking rückgängig zu machen. Abschließend wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion der DNA durchgeführt. Der eigentliche Nachweis der Bindung erfolgte im Anschluss mittels endpoint PCR (Strenkert et al., 2011a).

Literaturverzeichnis

- Almaraz-Delgado, A.L., Flores-Urbe, J., Pérez-España, V.H., Salgado-Manjarrez, E. & Badillo-Corona, J. A. (2014). Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express* 57 (4), p.57–65
- Arisue, N., Hashimoto, T., Lee, J. A., Moore, D. V., Gordon, P., Sensen, C. W., Gaasterland, T., Hasegawa, M. & Müller, M. (2002). The phylogenetic position of the pelobiont *Mastigamoeba balamuthi* based on sequences of rDNA and translation elongation factors EF-1 α and EF-2. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49 (1), pp.1–10
- Baba, M., Hanawa, Y., Suzuki, I. & Shiraiwa, Y. (2011). Regulation of the expression of H43/Fea1 by multi-signals. *Photosynthesis Research*. 109 (1-3), pp.169–177
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 22 (11), pp.1399–1408
- Barrera, D. J., Rosenberg, J. N., Chiu, J. G., Chang, Y. N., Debatis, M., Ngoi, S.-M., Chang, J. T., Shoemaker, C. B., Oyler, G. A. & Mayfield, S. P. (2015). Algal chloroplast produced camelid VH H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnology Journal*. 13 (1), pp.117–124
- Barros, M. D., Czarnecka, E. & Gurley, W. B. (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Molecular Biology*. 19 (4), pp.665–675
- Bateman, J. M. & Purton, S. (2000). Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. expression vectors and a new dominant selectable marker. *Molecular Genetics and Genomics* 263 (3), pp.404–410
- Battraw, M. J. & Hall, T. C. (1990). Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology*. 15 (4), pp.527–538
- Berger, H., Blifernez-Klassen, O., Ballottari, M., Bassi, R., Wobbe, L. & Kruse, O. (2014). Integration of carbon assimilation modes with photosynthetic light capture in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Plant*. 7 (10), pp.1545–1559
- Berthold, P., Schmitt, R. & Mages, W. (2002). An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*. 153 (4), pp.401–412
- Blankenship, J. E. & Kindle, K. L. (1992). Expression of chimeric genes by the light-regulated cabII-1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. a cabII-1/nit1 gene functions as a dominant selectable marker in a nit1- nit2- strain. *Molecular and Cellular Biology* 12 (11), pp.5268–5279

- Bodas, K., Brenig, C., Diller K. R. & Brand, J.J. (1995). Cryopreservation of blue-green and eukaryotic algae in the culture collection at the University of Texas at Austin. *Cryo-Letters* 16 (5), pp.267–274
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. & Sanford, J. C. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 240 (4858), pp.1534–1538
- Brehler, R., Klimek, L., Kopp, M. V. & Virchow, C. J. (2013). Specific immunotherapy-indications and mode of action. *Deutsches Ärzteblatt International*. 110 (9), pp.148–158
- Brown, L. E., Sprecher, S. L. & Keller, L. R. (1991). Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Molecular and Cellular Biology* 11 (4), pp.2328–2332
- Brueggeman, A. J., Bruggeman, A. J., Kuehler, D. & Weeks, D. P. (2014). Evaluation of three herbicide resistance genes for use in genetic transformations and for potential crop protection in algae production. *Plant Biotechnology Journal*. 12 (7), pp.894–902.
- Brunke, K. J., Anthony, J. G., Sternberg, E. J. & Weeks, D. P. (1984). Repeated consensus sequence and pseudopromoters in the four coordinately regulated tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and Cellular Biology*. 4 (6), pp.1115–1124
- Bukau, B., Weissman, J. & Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*. 125 (3), pp.443–451
- Cai, X. H., Brown, C., Adhiya, J., Traina, S. J. & Sayre, R. (1999). Growth and heavy metal binding properties of transgenic *Chlamydomonas* expressing a foreign metallothionein gene. *International Journal of Phytoremediation*. 1 (1), pp.53–65
- Calmels, T. P., Mistry, J. S., Watkins, S. C., Robbins, P. D., McGuire, R. & Lazo, J. (1993). Nuclear localisation of bacterial Streptoalloteichus hindustans bleomycin resistance protein in mammalian cells. *Molecular Pharmacology*. 44 (6), pp.1135–1141
- Cao, M., Fu, Y., Guo, Y. & Pan, J. (2009). *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma*. 235 (4), pp.107–110
- Chlamydomonas Ressource Center (2015). Strain CC-4350 cw15 arg7-8 mt+ [Matagne 302]. Available from: <http://chlamycollection.org/strain/cc-4350-cw15-arg7-8-mt-matagne-302/> [accessed 02.02.2015]
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*. 438 (7064), pp.90–93

- Cunniff, N. F. & Morgan, W. D. (1993): Analysis of heat shock element recognition by saturation mutagenesis of the human HSP70.1 gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 268 (11), pp. 8317–8324.
- Czerny, T.; Aghaallaei, N. & Bajoghli, B. (2005): Multiple Heat Shock Elements,. Veröffentlichungsnr: WO 2005/103265 A1.
- Damberger, F. F., Pelton, J. G., Harrison, C. J., Nelson, H. C. & Wemmer, D. E. (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Science*. 3 (10), pp.1806–1821
- Dauvillée, D., Delhay, S., Gruyer, S., Slomianny, C., Moretz, S. E., D'Hulst, C., Long, C. A., Ball, S. G. & Tomavo, S. (2010). Engineering the chloroplast targeted malarial vaccine antigens in *Chlamydomonas* starch granules. *PLoS ONE*. 5 (12), pp.e15424
- Davies, J. P., Weeks, D. P. & Grossman, A. R. (1992). Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Research*. 20 (12), pp.2959–2965
- Debuchy, R., Purton, S. & Rochaix, J. D. (1989). The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* : an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO Journal* 8 (10), pp.2803–2809
- Demurtas, O. C., Massa, S., Ferrante, P., Venuti, A., Franconi, R. & Giuliano, G. (2013). A *Chlamydomonas*-derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS ONE*. 8 (4), pp.e61473
- Deng, X., Yang, J., Wu, X., Li, Y. & Fei, X. (2014). A C2H2 zinc finger protein FEMU2 is required for fox1 expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE*. 9 (12), pp.e112977
- Doi, M., Inage, T. & Shioi, Y. (2001). Chlorophyll degradation in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant: An accumulation of pyropheophorbide a by anaerobiosis. *Plant and Cell Physiology*. 42 (5), pp.469–474
- Doi, M., Shima, S., Egashira, T., Nakamura, K. & Okayama, S. (1997). New bile pigment excreted by a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant: A possible breakdown catabolite of chlorophyll a. *Journal of Plant Physiology*. 150 (5), pp.504–508
- Dreesen, I. A., Charpin-El Hamri, G. & Fussenegger, M. (2010). Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Biotechnology*. 145 (3), pp.273–280
- Dunahay, T. G. (1993). Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *BioTechniques*. 15 (3), pp.452–455

- Eichler-Stahlberg, A., Weisheit, W., Ruecker, O. & Heitzer, M. (2009). Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 229 (4), pp.873–883
- Fei, X. & Deng, X. (2007). A novel Fe deficiency-responsive element (FeRE) regulates the expression of *atx1* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*. 48 (10), pp.1496–1503
- Fei, X., Eriksson, M., Li, Y. & Deng, X. (2010). A novel negative Fe-deficiency-responsive element and a TGGCA-type-like FeRE control the expression of *FTR1* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p.790247
- Fei, X., Eriksson, M., Yang, J. & Deng, X. (2009). An Fe deficiency responsive element with a core sequence of TGGCA regulates the expression of *FRT1* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biomedicine and Biochemistry*. 2, pp.157–166
- Ferrante, P., Diener, D. R., Rosenbaum, J. L. & Giuliano, G. (2011). Nickel and low CO₂-controlled motility in *Chlamydomonas* through complementation of a paralyzed flagella mutant with chemically regulated promoters. *BMC plant Biology* 11 (22), pp.1-8
- Ferris, P. J. (1995). Localization of the *nic-7*, *ac-29* and *thi-10* genes within the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 141 (2), pp.543–549
- Fischer, N. & Rochaix, J. D. (2001). The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*. 265 (5), pp.888–894
- Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D. & Storts, D. (1998). Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*. 65, pp.27–30
- Fuhrmann, M. (2004). Production of antigens in *Chlamydomonas reinhardtii* - green microalgae as a novel source of recombinant proteins. *Methods in Molecular Medicine* 94 (12), pp.191–195
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M. & Hegemann, P. (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology*. 55 (6), pp.869–881
- Fuhrmann, M., Oertel, W. & Hegemann, P. (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 19 (3), pp.353–361
- Gantar, M. & Svirčev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. *Journal of Phycology*. 44 (2), pp.260–268

- Gao, H., Wright, D. A., Li, T., Wang, Y., Horken, K., Weeks, D. P., Yang, B. & Spalding, M. H. (2014). TALE activation of endogenous genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 5, pp.52–60
- Garcia-Echauri, S. A. & Cardineau, G. A. (2015). TETX: a novel nuclear selection marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation. *Plant Methods* 11 (27), pp. 1-7
- Georgianna, D. R., Hannon, M. J., Marcuschi, M., Wu, S., Botsch, K., Lewis, A. J., Hyun, J., Mendez, M. & Mayfield, S. P. (2013). Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Algal Research*. 2 (1), pp.2–9
- Goldschmidt-Clermont, M. (1991) . A selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Research*. 19 (15), pp.4083–4089
- Gorman, D. S. & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin - their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54 (6), pp.1665–1669
- Gregory, J. A., Li, F., Tomosada, L. M., Cox, C. J., Topol, A. B., Vinetz, J. M. & Mayfield, S. (2012). Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS ONE*. 7 (5), pp.e37179
- Gregory, J. A., Topol, A. B., Doerner, D. Z. & Mayfield, S. (2013). Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(13), pp.3917–3925
- Greiner, A. (2014). CRISPR/Cas9 und Zinkfinger-Nukleasen für die gezielte Genstilllegung in *Chlamydomonas reinhardtii*. Doktorarbeit. Berlin:Humboldt Universität
- Grewe, S., Ballottari, M., Alcocer, M., D'Andrea, C., Blifern-Klassen, O., Hankamer, B., Mussnug, J. H., Bassi, R. & Kruse, O. (2014). Light-Harvesting Complex Protein LHCBM9 is Critical for Photosystem II Activity and Hydrogen Production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 26 (4), pp.1598–1611
- Griesbeck, C., Kobl, I. & Heitzer, M. (2006). *Chlamydomonas reinhardtii* - a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. *Molecular Biotechnology*. 34 (2), pp.213–223
- Griffiths, C. M. & Page, M. J. (1997). Production of heterologous proteins using the baculovirus/insect expression system. *Methods in Molecular Biology* 75 (34), pp.427–440
- Grossman, A. R., Harris, E. E., Hauser, C., Lefebvre, P. A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C. D., Stern, D., Vallon, O. & Zhang, Z. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the Crossroads of Genomics. *Eukaryotic Cell*. 2 (6), pp.1137-1150.
- Hahnewald, B. (2013). Auslegung, Konstruktion und Bau einer Gene Gun. Bachelorarbeit. Innsbruck:MCI

- Hall, L. M., Taylor, K. B. & Jones, D. D. (1993). Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*. 124 (1), pp.75–81
- Hallmann, A. & Wodniok, S. (2006). Swapped green algal promoters: aphVIII-based gene constructs with *Chlamydomonas* flanking sequences work as dominant selectable markers in *Volvox* and vice versa. *Plant Cell Reports*. 25 (6), pp.582–591
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4), pp.557–580
- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, pp.363–406
- Harris, E. H., Stern, D. B. & Witman, G. (Eds.) (2009a). The *Chlamydomonas* Sourcebook . Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press
- Harris, E. H., Stern, D. B. & Witman, G. (Eds.) (2009b). The *Chlamydomonas* Sourcebook . Organellar and Metabolic Processes. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press
- Hartl, F. Ulrich, Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 475 (7356), pp.324–332
- Hasnain, S. E., Manavathu, E. K. & Leung, W. C. (1985). DNA-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* cells: use of aminoglycoside 3'-phosphotransferase as a selectable marker. *Molecular and Cellular Biology*. 5 (12), pp.3647–3650
- He, D. M., Qian, K. X., Shen, G. F., Zhang, Z. F., Li, Y. N., Su, Z. L. & Shao, H. B. (2007). Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 55 (1), pp.26–30
- Heitzer, M., Eckert, A., Fuhrmann, M. & Griesbeck, C. (2007a). Influence of codon bias on the expression of foreign genes in microalgae. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 616, pp.46–53
- Heitzer, M. & Zschoernig, B. (2007b). Construction of modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using the Cre/lox-system. *Biotechniques*. 43 (3), pp.324–332
- Helliwell, K. E., Scaife, M. A., Sasso, S., Araujo, A. P., Purton, S. & Smith, A. G. (2014). Unraveling vitamin B12-responsive gene regulation in algae. *Plant Physiology*. 165 (1), pp.388–397
- Hörtensteiner, S., Vicentini, F. & Matile, P. (1995). Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: Enzymatic cleavage of phaeophorbide a in vitro. *New Phytologist*. 129 (2), pp.237–246

- Hou, Q., Qiu, S., Liu, Q., Tian, J., Hu, Z. & Ni, J. (2013). Selenoprotein-transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nutrients*. 5 (3), pp.624–636
- Huang, K. & Beck, C. F. (2003). Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (10), pp.6269–6274
- Hutner, S. H., Provasoli, L., Schatz, A. & Haskins, C. P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society* 94 (2), pp.152–170.
- Imam, S. H., Buchanan, M. J., Shin, H. C. & Snell, W. J. (1985). The *Chlamydomonas* cell wall :characterization of the wall framework. *The Journal of Cell Biology* 101 (4), pp.1599–1607
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96 (1), pp.23–28
- Invitrogen Homepage a (2015). Library Efficiency[®] DH5 α [™] Competent Cells. Available from: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/18263012.pdf> [accessed 02.02.2015]
- Invitrogen Homepage b (2015). One Shot PIR1 and PIR2. Available from: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/oneshotpir_man.pdf [accessed 02.02.2015]
- Iwai, M., Ikeda, K., Shimojima, M. & Ohta, H. (2014). Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation-inducible promoter. *Plant Biotechnology Journal*. 12 (6), pp.808–819
- Jacob, K. (2007) . Diplomarbeit: FH für angewandte Wissenschaften Anhalt
- Jaenicke, L., Kuhne, W., Spessert, R., Wahle, U. & Waffenschmidt, S. (1987). Cell-wall lytic enzymes (autolysins) of *Chlamydomonas reinhardtii* are (hydroxy)proline-specific proteases. *European Journal of Biochemistry*. 170 (1-2), pp.485–491
- Jiang, W., Brueggeman, A. J., Horken, K. M., Plucinak, T. M. & Weeks, D. P. (2014). Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 13 (11), pp.1465–1469
- Jones, C. S., Luong, T., Hannon, M., Tran, M., Gregory, J. A., Shen, Z., Briggs, S. P. & Mayfield, S. P. (2013). Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97 (5), pp.1987–1995

- Kang, M., Han, J. G., Liu, P. F., Ye, Y. & Tien, P. (2000). The regulation activity of Chlorella virus gene 5' upstream sequence in Escherichia coli and eucaryotic algae. *Chinese journal of biotechnology*. 16 (4), pp.443–446
- Kim, S., Lee, Y.-C., Cho, D.-H., Lee, H. Uk, Huh, Y. Suk, Kim, G.-J. & Kim, H.-S. (2014). A simple and non-invasive method for nuclear transformation of intact-walled *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE*. 9 (7), pp.e101018
- Kindle, K. L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (3), pp.1228-1232.
- Kindle, K. L. (1998). Nuclear transformation . *technology and applications*. In Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M. & Merchant, S. (Eds.). *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, pp.41–61. Kluwer Academic Publishers
- Kindle, K. L., Schnell, R. A., Fernandez, E. & Lefebvre, P. A. (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *The Journal of Cell Biology* 109 (6), pp.2589–2601
- Kindle, K. L. & Sodeinde, O. A. (1994). Nuclear and chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: strategies for genetic manipulation and gene expression. *Journal of Applied Phycology*. 6 (2), pp.231–238
- Kirchmayr, A. & Griesbeck, C. (2012). Genetic engineering, methods and targets. In Posten, C. & Walter, C. (Eds.). *Microalgal biotechnology*, pp.87–105. Berlin, Boston. Walter de Gruyter
- Kobayashi, Y., Harada, N., Nishimura, Y., Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., Kuroiwa, T. & Misumi, O. (2014). Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in Cyanidioschyzon merolae and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genome Biology and Evolution*. 6 (10), pp.2731–2740
- Kothgassner, S. (2013). Promotorstudien für die verbesserte Transgenexpression in *Chlamydomonas reinhardtii*. Masterarbeit. Innsbruck: MCI
- Kovar, J. L., Zhang, J., Funke, R. P. & Weeks, D. P. (2002). Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. *The Plant Journal* 29 (1), pp.109–117
- Kozminski, K. G., Diener, D. R. & Rosenbaum, J. L. (1993). High level expression of nonacetylatable alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell motility and the Cytoskeleton*. 25 (2), pp.158–170

- Kräutler, B. & Hörtensteiner, S. (2006). Chlorophyll breakdown. In Grimm, B.(Ed.). Chlorophylls and bacteriochlorophylls, pp.240–257. Dordrecht. Springer
- Kremers, G.-J.,Goedhart, J.,van Munster, Erik B & Gadella, Theodorus W J (2006). Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry* 45 (21), pp.6570–6580
- Kropat, J. & Beck, C. F. (1998). Characterization of Photoreceptor and Signaling Pathway for Light Characterization of Photoreceptor and Signaling Pathway for Light Induction of the *Chlamydomonas* Heat-Shock Gene HSP70A. *Photochemistry and Photobiology*. 68 (3), pp.414–419
- Kropat, J.,Oster, U.,Rüdiger, W. & Beck, C. F. (1997). Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25), pp.14168–14172
- Kucho, K. i.,Ohyama, K. & Fukuzawa, H. (1999). CO₂-responsive transcriptional regulation of CAH1 encoding carbonic anhydrase is mediated by enhancer and silencer regions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 121 (4), pp.1329–1337
- Kumar, S. V.,Misquitta, R. W.,Reddy, V. S.,Rao, B. J. & Rajam, M. V. (2004). Genetic transformation of the green alga-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 166 (3), pp.731–738
- Ladygin, V. G. & Butanaev, A. M. (2002). Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 with the hygromycin phosphotransferase gene as a selective marker. *Russian Journal of Genetics* 38 (9), pp.1009-1014
- Lam, A. J.,St-Pierre, F.,Gong, Y.,Marshall, J. D.,Cranfill, P. J.,Baird, M. A.,McKeown, M. R.,Wiedenmann, J.,Davidson, M. W.,Schnitzer, M. J.,Tsien, R. Y. & Lin, M. Z. (2012). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature Methods*.9 (10), pp.1005–1012
- Lambertz, C.,Hemschemeier, A. & Happe, T. (2010). Anaerobic expression of the ferredoxin-encoding FDX5 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* is regulated by the Crr1 transcription factor. *Eukaryotic cell* 9 (11), pp.1747–1754
- Lauersen, K. J.,Kruse, O. & Mussgnug, J. H. (2015). Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (8), pp.3491–3503
- Lee, J. Hee,Hubel, A. & Schoffl, F. (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *The Plant Journal* 8 (4), pp.603–612

- Leisinger, U., Rüfenacht, K., Fischer, B., Pesaro, M., Spengler, A., Zehnder, A. J. & Eggen, R. I. (2001). The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology* 46 (4), pp.395–408
- Lim, J.-M., Ahn, J.-W., Hwangbo, K., Choi, D.-W., Park, E.-J., Hwang, M. Sook, Liu, J. Ryol & Jeong, W.-J. (2013). Development of cyan fluorescent protein (CFP) reporter system in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and macroalgae *Pyropia* sp. *Plant Biotechnology Reports* 7 (3), pp.407–414
- Liu, Q., Li, M. Z., Leibham, D., Cortez, D. & Elledge, S. J. (1998). The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Current biology* 8 (24), pp.1300–1309
- Lodha, M. & Schroda, M. (2005). Analysis of chromatin structure in the control regions of the *Chlamydomonas HSP70A* and *RBCS2* genes. *Plant Molecular Biology* 59 (3), pp.501–513
- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M. C. & Matagne, R. F. (1999). Transcriptional regulation of the *Nia1* gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*. effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the *Nia1* promoter. *Plant Molecular Biology*. 41 (5), pp.701–711
- Lumbreras, V., Stevens, D. R. & Purton, S. (1998). Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *The Plant Journal* 14 (4), pp.441–447
- Macherey- Nagel (2015a). Nucleo Spin Plasmid Kit. Available from: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf [accessed 02.02.2015]
- Macherey-Nagel (2015b). Nucleo Spin Gel and PCR clean up. Available from: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20cleanup/UM_PCRcleanup_Gelex_NSgelPCR.pdf [accessed 02.02.2015]
- Mägdefrau, M. (2007). Ortsgerichtete Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* am Beispiel des Cre/lox-Systems . Doktorarbeit. Regensburg:Universität Regensburg
- Mamedov, T. & Yusibov, V. (2011). Green algae *Chlamydomonas reinhardtii* possess endogenous sialylated N-glycans. *FEBS open bio* 1, pp.15–22
- Manuell, A. L., Beligni, M. V., Elder, J. H., Siefker, D. T., Tran, M., Weber, A., McDonald, T. L. & Mayfield, S. P. (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal*. 5 (3), pp.402–412

- Markwardt, M. L., Kremers, G.J., Kraft, C. A., Ray, K., Cranfill, P.J., Wilson, K. A., Day, R. N., Wachter, R. M., Davidson, M. W. & Rizzo, M. A. (2011). An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS ONE*. 6 (3), pp.e17896
- Mathieu-Rivet, E., Kiefer-Meyer, M.-C., Vanier, G., Ovide, C., Burel, C., Lerouge, P. & Bardor, M. (2014). Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. *Frontiers in Plant Science* 5 (359), pp. 1-13
- Matile, P., Hortensteiner, S. & Thomas, H. (1999). Chlorophyll Degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, pp.67–95
- Matthews, J. C., Hori, K. & Cormier, M. J. (1977). Purification and Properties of *Renilla reniformis* Luciferase. *Biochemistry*. 16 (1), pp.85–91
- Maul, J. E., Lilly, J. W., Cui, L., dePamphilis, C. W., Miller, W., Harris, E. H. & Stern, D. B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *The Plant Cell* 14 (11), pp.2659–2679
- Mayfield, S. P., Franklin, S. E. & Lerner, R. A. (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 100(2), pp.438–442
- Mayfield, S. P. & Kindle, K. L. (1990). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 87 (6), pp.2087–2091
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Marechal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C. L., Cognat, V., Croft, M. T., Dent, R., Dutcher, S., Fernandez, E., Fukuzawa, H., Gonzalez-Ballester, D., Gonzalez-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P. A., Lemaire, S. D., Lobanov, A. V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J. V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A. M., Niyogi, K., Novoselov, S. V., Paulsen, I. T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J. P., Riano-Pachon, D. M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S. L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C. J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M. R., Ledford, H., Long, J. C., Minagawa, J., Page, M. D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A. M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C. L., Gladyshev, V. N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R. T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y. W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W. C., Otiilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski,

- L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S. & Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318 (5848), pp.245–250
- Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S., Gadella, Theodorus W J & Chudakov, D. M. (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods*. 4 (7), pp.555–557
- Michelet, L., Lefebvre-Legendre, L., Burr, S. E., Rochaix, J.-D. & Goldschmidt-Clermont, M. (2011). Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant biotechnology journal* 9 (5), pp.565–574
- Mitra, A. & Higgins, D. W. (1994a). The *Chlorella* virus adenine methyltransferase gene promoter is a strong promoter in plants. *Plant Molecular Biology* 26 (1), pp.85–93
- Mitra, A., Higgins, D. W. & Rohe, N. J. (1994b). A *Chlorella* virus gene promoter functions as a strong promoter both in plants and bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204 (1), pp.187–194
- Mitra, A. & Van Etten, J. L. (2001). Promoters from *Chlorella* virus genes providing for expression of genes in prokaryotic and eukaryotic hosts. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents*. 4
- Monk, B. C., Adair, W. S., Cohen, R. A. & Goodenough, U. W. (1983). Topography of *Chlamydomonas* - fine structure and polypeptide components of the gametic flagellar membrane surface and the cell wall. *Planta* 158 (6), pp.517–533
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro - the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia Quantative Biology* 51 (1), pp.263–273
- Mussnug, J. H. (2015). Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (13), pp.5407–5418
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*. 20 (1), pp.87–90
- Nelson, J. A., Savereide, P. B. & Lefebvre, P. A. (1994). The CRY1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* - Structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Molecular and Cellular Biology* 14 (6), pp.4011–4019

- Neupert, J., Karcher, D. & Bock, R. (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal* 57 (6), pp.1140–1150
- New England Biolabs (2015a). Antarctic Phosphatase. Available from:
<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/AC0AF8BCDD74BDCBBAF6D872BDCB8FB/Datacards%20or%20Manuals/M0289Datasheet-Lot0191204.pdf> [accessed 27.02.2015]
- New England Biolabs (2015b). Cre Recombinase. Available from:
<http://international.neb.com/~media/Catalog/All-Products/869166C106404361A80AB5B6D0C75757/Datacards%20or%20Manuals/M0298Datasheet-Lot0081205.pdf> [accessed 02.02.2015]
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A. & Scharf, K. D. (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell stress and Chaperones*. 6 (3), pp.177–189
- Nover, L., Scharf, K. D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czarnecka-Verner, E. & Gurley, W. B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell stress and Chaperones* 1 (4), pp.215–223
- Ohresser, M., Matagne, R. F. & Loppes, R. (1997). Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 31 (3), pp.264–271
- Ortner, V., Ludwig, A., Riegel, E., Dunzinger, S. & Czerny, T. (2015). An artificial HSE promoter for efficient and selective detection of heat shock pathway activity. *Cell Stress and Chaperones* 20 (2), pp.277–288
- Pape, M., Lambertz, C., Happe, T. & Hemschemeier, A. (2012). Differential expression of the *Chlamydomonas* [FeFe]-hydrogenase-encoding HYDA1 gene is regulated by the copper response regulator1. *Plant Physiology*. 159 (4), pp.1700–1712
- Park, S., Lee, Y., Lee, J.-H. & Jin, E. (2013). Expression of the high light-inducible *Dunaliella* LIP promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 238 (6), pp. 1147–1156
- Paszowski, J. & Whitham, S. A. (2001). Gene silencing and DNA methylation processes. *Current Opinion in Plant Biology*. 4 (2), pp.123–129
- Peteranderl, R., Rabenstein, M., Shin, Y. K., Liu, C. W., Wemmer, D. E., King, D. S. & Nelson, H. C. (1999). Biochemical and biophysical characterization of the trimerization domain from the heat shock transcription factor. *Biochemistry* 38 (12), pp.3559–3569

- Petrovsky, N. & Aguilar, J. César (2004). Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 82 (5), pp.488–496
- Powell, A. L. (1947). The fundamentals of fluorescence. *Journal of Chemical Education* 24 (9), p.423
- Pratheesh, P. T., Vineetha, M. & Kurup, G. Muraleedhara (2014). An efficient protocol for the Agrobacterium-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*. 56 (6), pp.507–515
- Pruzinska, A., Tanner, G., Anders, I., Roca, M. & Hortensteiner, S. (2011). Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25), pp.15259–15264
- Quinn, J. M., Kropat, J. & Merchant, S. (2003). Copper response element and *Crr1*-dependent Ni(2+)-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 2 (5) pp.995-1002
- Randolph-Anderson, B. L., Sato, R., Johnson, A. M., Harris, E. H., Hauser, C. R., Oeda, K., Ishige, F., Nishio, S., Gillham, N. W. & Boynton, J. E. (1998). Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* conferring resistance to porphyrinic herbicides. *Plant Molecular Biology*. 38 (5), pp.839–859
- Rasala, B. A., Barrera, D. J., Ng, J., Plucinak, T. M., Rosenberg, J. N., Weeks, D. P., Oyler, G. A., Peterson, T. C., Haerizadeh, F. & Mayfield, S. P. (2013). Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 74 (4), pp.545–556
- Rasala, B. A., Lee, P. A., Shen, Z., Briggs, S. P., Mendez, M. & Mayfield, S. P. (2012). Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS ONE*. 7 (8), pp.e43349
- Rasala, B. A., Muto, M., Lee, P. A., Jager, M., Cardoso, R. M., Behnke, C. A., Kirk, P., Hokanson, C. A., Crea, R., Mendez, M. & Mayfield, S. P. (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal* 8 (6), pp.719–733
- Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M. & Bonnefoy, N. (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proceedings of the National Academy of Science in the United States of America* 103(12), pp.4771–4776

- Remacle, C., Cline, S., Boutaffala, L., Gabilly, S., Larosa, V., Barbieri, M. R., Coosemans, N. & Hamel, P. P. (2009). The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 8 (9), pp.1460–1463
- Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B. & Piston, D. W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology*. 22 (4), pp.445–449
- Rodoni, S., Vicentini, F., Schellenberg, M., Matile, P. & Hortensteiner, S. (1997). Partial Purification and Characterization of Red Chlorophyll Catabolite Reductase, a Stroma Protein Involved in Chlorophyll Breakdown. *Plant Physiology* 115 (2), pp.677–682
- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L. & Betenbaugh, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*. 19 (5), pp.430–436
- Ruecker, O., Zillner, K., Groebner-Ferreira, R. & Heitzer, M. (2008). Gaussia-luciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genetics and Genomics*. 280 (2), pp.153–162
- Sager, R., Granick, S. (1954). Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of General Physiology*. 37 (6), pp.729–742
- Sawyer, A. L., Hankamer, B. D. & Ross, I. L. (2015). Sulphur responsiveness of the *Chlamydomonas reinhardtii* LHCBM9 promoter. *Planta*. 241 (5), pp.1287–1302
- Sayre, R.; Wagner, R.; Siripornadulsil, S.; Farias, C. (2001): Transgenic algae for delivering antigens to an animal ; Sayre, R.; Wagner, R. E. ; Siripornadulsil, S. ; & Farias, C., Veröffentlichungsnr: WO2001098335A2
- Schmollinger, S., Strenkert, D. & Schroda, M. (2010). An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Current Genetics* 56 (4), pp.383–389
- Schöffl, F., Prändl, R. & Reindl, A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiology* 117 (4), pp.1135–1141
- Schroda, M., Beck, C. F. & Vallon, O. (2002). Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 31 (4), pp.445–455
- Schroda, M., Blöcker, D. & Beck, C. F. (2000). The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 21 (2), pp.121–131

- Schroda, M., Hemme, D. & Mühlhaus, T. (2015). The *Chlamydomonas* heat stress response. *The Plant Journal* 82 (3), pp. 466–480
- Schulz-Raffelt, M., Lodha, M. & Schroda, M. (2007). Heat shock factor 1 is a key regulator of the stress response in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 52 (2), pp. 286–295
- Shamovsky, I. & Nudler, E. (2008). New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (6), pp. 855–861
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 22 (12), pp. 1567–1572
- Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. & Tsien, R. Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods* 5 (6), pp. 545–551
- Shao, N. & Bock, R. (2008). A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 53 (6), pp. 381–388
- Shao, N., Krieger-Liszka, A., Schroda, M. & Beck, C. F. (2007). A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced in vivo. *The Plant Journal* 50 (3), pp. 475–487
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 59 (3), pp. 223–239
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D. P. & Sayre, R. T. (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell*. 14 (11), pp. 2837–2847
- Sizova, I., Fuhrmann, M. & Hegemann, P. (2001). A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 277 (1-2), pp. 221–229
- Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S. & Hegemann, P. (2013). Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *The Plant Journal* 73 (5), pp. 873–882
- Specht, E., Miyake-Stoner, S. & Mayfield, S. (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Letters* 32 (10), pp. 1373–1383

- Specht, E. A., Nour-Eldin, H.H., Hoang, K. T. & Mayfield, S. P. (2015). An improved ARS2-derived nuclear reporter enhances the efficiency and ease of genetic engineering in *Chlamydomonas*. *Biotechnology Journal*. 10 (3), pp.473–479
- Stevens, D. R., Atteia, A., Franzen, L. G. & Purton, S. (2001). Cycloheximide resistance conferred by novel mutations in ribosomal protein L41 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics* 264 (6), pp.790–795
- Stevens, D. R., Rochaix, J. D. & Purton, S. (1996). The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Molecular and General Genetics* 251 (1), pp.23–30
- Stokes, G. G. (1852). On the Change of Refrangibility of Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 142 (1), pp.463–562
- Strenkert, D., Schmollinger, S. & Schroda, M. (2011a). Protocol: methodology for chromatin immunoprecipitation (ChIP) in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant methods*. 7 (1), p.1-9
- Strenkert, D.; Schmollinger, S.; Sommer, F.; Schulz-Raffelt, M. & Schroda, M. (2011b): Transcription Factor-Dependent Chromatin Remodeling at Heat Shock and Copper-Responsive Promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*, *The Plant Cell* 23 (6), pp. 2285–2301
- Strenkert, D., Schmollinger, S. & Schroda, M. (2013). Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Research* 41 (10), pp.5273–5289
- Su, Z. L., Qian, K. X., Tan, C.P., Meng, C. X. & Qin, S. (2005). Recombination and Heterologous Expression of Allophycocyanin Gene in the Chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37 (10), pp.709–712
- Sun, M., Qian, K., Su, N., Chang, H., Liu, J. & Chen, G. (2003). Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters* 25 (13), pp.1087–1092
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J. D., Ajam, T. & Surzycki, S. (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* 37 (3), pp.133–138
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82 (4), pp.1074–1078
- Takamiya, K. I., Tsuchiya, T. & Ohta, H. (2000). Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends in Plant Science*. 5 (10), pp.426–431

- Tanaka, Y., Nishiyama, Y. & Murata, N. (2000). Acclimation of the photosynthetic machinery to high temperature in *Chlamydomonas reinhardtii* requires synthesis de novo of proteins encoded by the nuclear and chloroplast genomes. *Plant physiology* 124 (1), pp.441–449
- Tang, D. K., Qiao, S. Y. & Wu, M. (1995). Insertion mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation and heterologous DNA. *Biochemistry and Molecular Biology International* 36 (5), pp.1025–1035
- Thermo Scientific (2015a). 1 kb ladder. Available from: <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-1-kb-dna-ladder-250-to-10000-bp/> [accessed 02.02.2015]
- Thermo Scientific (2015b). 50 bp ladder. Available from: <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-50-bp-dna-ladder/> [accessed 02.02.2015]
- Thermo Scientific (2015c). Klenow Fragment. Available from: <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/prodinfo-EP0051-Klenow-Fragment.pdf> [accessed 02.02.2015]
- Thermo Scientific (2015d). Ta DNA Ligase. Available from: <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/el001-product-information.pdf> [accessed 02.02.2015]
- Thermo Scientific (2015e). Taq DNA Polymerase. Available from: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0012026_TaqDNAPolymerase_recombinant_5_UuL_100U_UG.pdf [accessed 02.02.2015]
- Tran, M., Henry, R. E., Siefker, D., Van, C., Newkirk, G., Kim, J., Bui, J. & Mayfield, S. P. (2013a). Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnology and Bioengineering*. 110 (11), pp.2826–2835
- Tran, M., Van, C., Barrera, D. J., Pettersson, P. L., Peinado, C. D., Bui, J. & Mayfield, S. P. (2013b). Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (1), pp.E15-22
- Tran, M., Zhou, B., Pettersson, P. L., Gonzalez, M. J. & Mayfield, S. P. (2009). Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnology and Bioengineering* 104(4), pp.663–673
- Treuter, E., Nover, L., Ohme, K. & Scharf, K. D. (1993). Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Molecular and General Genetics* 240 (1), pp.113–125

- Villand, P., Eriksson, M. & Samuelsson, G. (1997). Carbon dioxide and light regulation of promoters controlling the expression of mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Biochemical Journal* 327 (1), pp.51–57
- Von Gromoff, E. D., Treier, U. & Beck, C. F. (1989). Three light-inducible heat shock genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and Cellular Biology*. 9 (9), pp.3911–3918
- Voytsekh, O., Seitz, S. B., Iliev, D. & Mittag, M. (2008). Both subunits of the circadian RNA-binding protein CHLAMY1 can integrate temperature information. *Plant Physiology*. 147 (4), pp.2179–2193
- Waffenschmidt, S. (2011). Autolysin Preparation. Available from:
<http://www.chlamy.org/methods/autolysin2.html> [accessed 05.06.2015]
- Walker, T. L., Becker, D. K. & Collet, C. (2005). Characterisation of the *Dunaliella tertiolecta* RbcS genes and their promoter activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Reports*. 23 (10-11), pp.727–735
- Wang, X., Brandsma, M., Tremblay, R., Maxwell, D., Jevnikar, A. M., Huner, N. & Ma, S. (2008). A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnology* 8, pp.87–99
- Whittaker, P. A. (1993). A simple, reliable method for prolonged frozen storage of *Chlamydomonas*. *Trends in Genetics*. 9 (6), pp.194–196
- Wurm, F. & Bernard, A. (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology* 10 (2), pp.156–159
- Xia, Y. (2001): *Chlorella* Virus Promoters. Veröffentlichungsnr: US 631622431. Patent 5846774.
- Xia, Y. (2002): Plant containing a gene construct comprising a chlorella virus promoter and a lac operon. Patent 6395965.
- Yang, Z., Li, Y., Chen, F., Li, D., Zhang, Z., Liu, Y., Zheng, D., Wang, Y. & Shen, G. (2006). Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chinese Science Bulletin* 51 (14), pp.1703–1709
- Yoon, S.M., Kim, S. Y., Li, K. F., Yoon, B. H., Choe, S. & Kuo, M. M. (2011). Transgenic microalgae expressing *E. coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91 (3), pp.553–563
- Zhang, Y. K., Shen, G.F. & Ru, B.G. (2005). Survival of human metallothionein-2 transplastomic *Chlamydomonas reinhardtii* ultraviolet B exposure. *Acta Biochimica Biophysica Sinica* 38 (3), pp.187–193

Anhang

Plasmide für Fusion und Grundplasmide

Tabelle 21. Plasmide für Fusion und Grundplasmide

Plasmidname	Beschreibung
pXX186	Grundlage für pMCI7-12 und pMCI50-52
pXX208	Enthält Argininen für Selektion der <i>C. reinhardtii</i> Klone
pSGH2	Grundlage für pMCI49 und pMCI50-enthält HSE8x
pMS188	Grundlage für pMCI106 und 107 - enthält <i>HSP70A</i> Promotor lang
pBR9mCherry	Plasmid vom Labor von Prof. Stephen Mayfield - enthält mCherry- <i>ble2A</i> Fusionsprotein

Plasmide mit Viruspromotoren

Tabelle 22: Plasmide mit Viruspromotoren

Plasmidderivat Name	Ursprungsplasmid	Chlorella Virus Promotor
pMCI7	pXX186	DNA Topoisomerase II Gen
pMCI8	pXX186	Coat Like Protein Gen
pMCI10	pXX186	K ⁺ -Ionenkanalprotein Gen
pMCI11	pXX186	DNA Polymerase Gen
pMCI12	pXX186	Chitinase Gen

Fusionsplasmide mit Viruspromotoren

Tabelle 23: Fusionsplasmide mit Viruspromotoren

Plasmidname	Fusion	Chlorella Virus Promotor
pMCI13	pMCI7+pXX208	DNA Topoisomerase II Gen
pMCI14	pMCI8+pXX208	Coat Like Protein Gen
pMCI16	pMCI10+pXX208	K ⁺ - Ionenkanalprotein Gen
pMCI17	pMCI11+pXX208	DNA Polymerase Gen
pMCI18	pMCI12+pXX208	Chitinase Gen

Kontroll-Fusionsplasmide für Viruspromotoren

Tabelle 24: Kontrollfusionsplasmide

Plasmidname	Fusion	Beschreibung
pMCI26	pXX186+pXX208	Ohne Viruspromotor-Negativkontrolle
pMCI27	pXX186 ohne Luc+pXX208	Ohne Luciferase-Negativkontrolle
pXX250	pXX186+pXX208	Mit Introns Positivkontrolle
pXX209	pXX186+pXX208	Positivkontrolle

Plasmide mit HSE8x

Tabelle 25: Plasmide mit HSE8x

Plasmidname	Ursprungsplasmid	Promotor
pMCI50	pXX186	<i>RBCS2</i> ohne <i>HSP70A</i>
pMCI51	pXX186 und pSGH2	<i>RBCS2</i> und HSE8x
pMCI52	pXX186 und pSGH2	HSE8x

Fusionsplasmide mit HSE8x

Tabelle 26: Fusionsplasmide mit HSE8x

Plasmidname	Fusion	Promotor
pMCI53	pMCI50+pXX208	<i>RBCS2</i> ohne <i>HSP70A</i>
pMCI54	pMCI51+pXX208	<i>RBCS2</i> und HSE8x
pMCI55	pMCI52+pXX208	HSE8x

Plasmide mit Kern tagRFP

Tabelle 27: Plasmide mit Kern tagRFP

Plasmidname	Ursprungsplasmid	Promotor
pMCI76	pXX37	<i>RBCS2</i> ohne <i>HSP70A</i>
pMCI77	pXX37	<i>RBCS2</i> und HSE8x
pMCI78	pXX37	HSE8x

Plasmide mit Chloroplasten tagRFP

Tabelle 28: Plasmide mit Chloroplasten tagRFP

Plasmidname	Ursprungsplasmid	Beschreibung
pMCI92	p463 (Goldschmidt-Clermont, 1991), cp_RFP-pMK (Eurofins Genomics)	5' und 3' rbcL, tsca, cpRFP
pMCI93	p463 (Goldschmidt-Clermont, 1991), cp_RFP-pMK (Eurofins Genomics)	2x 5' und 3' rbcL, tsca, cpRFP, aadA

Plasmide mit HSE1x-6x

Tabelle 29: Plasmide mit HSE1x-6x

Plasmidname	Ursprungsplasmid	Beschreibung
pMCI94	pXX186	HSE1x- <i>RBCS2</i> Luciferase
pMCI95	pXX186	HSE2x- <i>RBCS2</i> Luciferase
pMCI96	pXX186	HSE3x- <i>RBCS2</i> Luciferase
pMCI97	pXX186	HSE4x- <i>RBCS2</i> Luciferase
pMCI98	pXX186	HSE5x- <i>RBCS2</i> Luciferase
pMCI99	pXX186	HSE6x- <i>RBCS2</i> Luciferase

Fusionsplasmide mit HSE1x-6x

Tabelle 30: Fusionsplasmide mit HSE1x-6x

Plasmidname	Fusion	Beschreibung
pMCI100	pMCI94+pXX208	HSE1x- <i>RBCS2</i> Luciferase+Arg
pMCI101	pMCI95 +pXX208	HSE2x- <i>RBCS2</i> Luciferase+Arg
pMCI102	pMCI96+pXX208	HSE3x- <i>RBCS2</i> Luciferase+Arg
pMCI103	pMCI97+pXX208	HSE4x- <i>RBCS2</i> Luciferase+Arg
pMCI104	pMCI98+pXX208	HSE5x- <i>RBCS2</i> Luciferase+Arg
pMCI105	pMCI99+pXX208	HSE6x- <i>RBCS2</i> Luciferase+Arg

Plasmide mit HSP70A_{lang}

Tabelle 31: Plasmide mit HSP70A_{lang}

Plasmidname	Ursprungsplasmid	Promotor
pMCI106	pXX186+pMS188	<i>HSP70A_{lang}</i> +Luc
pMCI107	pMCI106+pXX208	<i>HSP70A_{lang}</i> +Luc+Arg

Plasmide für Vergleich mCherry/tagRFP

Tabelle 32: Plasmide für Vergleich mCherry/tagRFP

Plasmidderivat Name	Ursprungsplasmid	Eigenschaften
pMCI108	pMCI76/pexK4mCherry (Eurofins Genomics)	<i>ble2A</i> -mCherry
pMCI109	pMCI76/pexK4mCherry (Eurofins Genomics)	<i>ble</i> -mCherry
pMCI110	pMCI76/pexK4mCherry (Eurofins Genomics)	<i>ble2A</i> -tagRFP

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt habe. Alle Inhalte, die in ihrem Wortlaut oder Sinn aus anderen Werken entnommen wurden, wurden durch die Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Es fand keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberatern statt.

Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad im Promotionsfach Biologie beworben und besitze keinen Doktorgrad im Promotionsfach Biologie. Weiterhin wurde die vorliegende Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht, angenommen oder abgelehnt.

Die Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 21/2009 am 06.07.2009 habe ich zur Kenntnis genommen. Die Grundsätze der Humboldt Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden eingehalten.“

Innsbruck, 31.07.2015

Ort, Datum

Anna Kirchmayr

Unterschrift